

جامعة حلب
كلية العلوم
قسم علم الحياةالنباتية



تحديد التباينات الوراثية النيوكليوتيدية المفردة عند الشعير

رسالة قدمت لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الحيوية
(وراثة نباتية)

إعداد

سامر لبابيدي

ميلادي 2010

هجري 1431





تحديد التباينات الوراثية النكليوتيدية المفردة عند الشعير

رسالة قدمت لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الحيوية
(وراثة نباتية)

إعداد

سامر لبابيدي

إجازة في العلوم الحيوية، كلية العلوم، جامعة حلب - 1997

دبلوم الدراسات العليا في الوراثة النباتية، كلية العلوم، جامعة حلب - 1998

ماجستير في الوراثة النباتية، كلية العلوم، جامعة حلب - 2004

بإشراف

الدكتور وليد السعيد

أستاذ في الوراثة النباتية، قسم علم الحياة النباتية
كلية العلوم، جامعة حلب
حلب، سوريا

الدكتور مايكل باوم

رئيس قسم التنوع الحيوي والإدارة المتكاملة
للمورثات في المركز الدولي للبحوث الزراعية
في المناطق الجافة (ايكاردا)، حلب، سوريا

بالتعاون مع

الدكتور أحمد جاهور

مربي شعير وأستاذ التقانات الحيوية في
جامعة كوبنهاغن، الدنمارك

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في العلوم الحيوية (وراثة نباتية)، من كلية العلوم في جامعة حلب

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirements for the degree of Ph.D. in Plant Genetic, at the Faculty of Science, Aleppo University.

نوقشت هذه الأطروحة في جلسة علنية بتاريخ 2010/06/22 ,أجيزت أمام لجنة الحكم المؤلفة من السادة:

الأستاذ الدكتور محمـــد معـــلا

الأستاذ الدكتور وليـد علـي السعيـد

الأستاذ الدكتور أحمـد الفـرحان

الأستاذ المساعد الدكتور كنان دركزنلي

الأستاذ المساعد الدكتور عبد الله بركات

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة **"تحديد التباينات الوراثية النيوكليوتيدية المفردة عند الشعير"** هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح بإشراف الدكتور وليد السعيد، أستاذ في قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم جامعة حلب، سوريا، والدكتور مايكل باوم رئيس قسم التنوع الحيوي والإدارة المتكاملة للمورثات في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا) حلب، سوريا، وبالتعاون مع الدكتور أحمد جاهور مربي شعير وأستاذ التقانات الحيوية في جامعة كوبنهاغن، الدنمارك، وأية مراجع أخرى بحثت في هذه الرسالة موثقة في النص

المرشح		**بإشراف**
....	....	....
سامر لبابيدي	د. وليد السعيد	د. مايكل باوم

التاريخ: 2010/06/22

CERTIFICATION

It is hereby certified that the work described in this thesis "**Detection of Single Nucleotide Polymorphism in Barley Population**" is the results of Samer Lababidi own investigations under the supervision of Dr. Walid Al-Saiid, Faculty of Science, Aleppo University and, Dr. Michael Baum, Biotechnology Laboratory, ICARDA, Aleppo, Syria and any reference to other researcher's work has been duly acknowledged in the text

Candidate	**Supervisors**	
....	....	....
Samer Lababidi	*Dr. Walid Al-Saiid*	*Dr. Michael Baum*

Date: 22,06,2010

تصريح

أصرح بأن هذا البحث "**تحديد التباينات الوراثية النيوكليوتيدية المفردة عنـــد الشـــعير**" لـــم يسبق أن قبل للحصول على شهادة وهو غير مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشح

....

سامـــر لبابيـــدي

التاريخ: 2010/06/22

DECLARATION

This work **"Detection of Single Nucleotide Polymorphism in Barley Population"** has not being submitted concurrently for any other degree.

Candidate

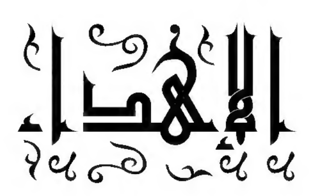
....

Samer Lababidi

Date: 22,06,2010

شكر وتقدير

- بداية أشكر الله عز وجل وأحمده على توفير كافة السبل لإنجاز هذا العمل
- بفيض من الحب والتقدير أتقدم بخالص الشكر والامتنان إلى أستاذي المشرفين الدكتور وليد السعيد والدكتور مايكل باوم على ما أبديا من جهود مباركة في الإشراف على هذا البحث فكانت توجيهاتهما وإرشادتهما موضع تقدير واهتمام
- كما أخص بالذكر الدكتور أحمد جاهور من جامعة كوبنهاغن في الدانمارك لمساهمته في الإشراف على هذا البحث ولجهوده المتميزة ومشاركته الفاعلة في هذا العمل
- يسرني أن أتقدم بخالص الشكر ووافر الامتنان للجنة الحكم المتمثلة بالأستاذ الدكتور محمد معلا رئيس جامعة تشرين (كان قد شرفني بتحكيمه رسالة الماجستير وهاهو يشرفني أيضاً بتحكيمه لرسالة الدكتوراه) والدكتور أحمد فرحان من كلية الزراعة بجامعة الفرات والدكتور كنان دركزنلي من كلية الزراعة بجامعة حلب والدكتور عبد الله بركات من كلية العلوم بجامعة والدكتور وليد السعيد ايضاً فلهم مني كل الشكر
- كما أخص بالشكر الدكتورة نينا يانسن من جامعة كوبنهاغن في الدانمارك عرفاناً لها وتقديراً لجهودها المتميزة في هذا العمل في الجانب النظري والعملي
- أخص بالشكر الآنسة إيناس جنباز من مخبر التقانات الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة ايكاردا كمساعدة تقنية في الجانب العملي لهذا البحث
- أخص بالشكر كلٍ من الدكتور غونثر باكس والسيدة أنيته مولر والسيد روان نيد من جامعة كوبنهاغن في الدانمارك لما أبدوه من تعاون
- الشكر كل الشكر لجميع العاملين في مخبر التقانات الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة ايكاردا
- كل الشكر للدكتورة دانا جودت من هيئة الطاقة الذرية بدمشق لتدقيقها الأطروحة علمياً
- لمسة وفاء وعظيم الشكر والعرفان إلى كل من زودني بكلمة نور ومعرفة

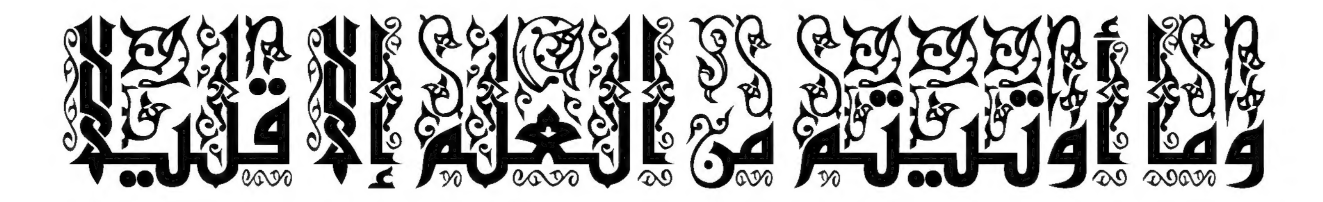


إلى روح والدي رحمه الله

إلى والدتي أطال الله في عمرها

إلى أخي وأختي





صدق الله العظيم

تم هذا البحث بالتعاون مابين جامعة حلب – كلية العلوم – والمركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ICARDA)، وقد تم تفيـذ الجـزء العلمي في مخبر التقانات الحيوية في المركز الـدولي للبحـوث الزراعيـة (ايكاردا)، وفي مخبر التقانات الحيوية، قسم الزراعة وعلم البيئـة ، كليـة علوم الحياة، جامعة كوبنهاغن، في الدنمارك.

فهرس المحتويات

فهرس الجداول

فهرس الأشكال

الملخص باللغة العربية

تطورت معرفتنا بالبيولوجيا الجزيئية خلال السنتين الماضيتين بشكل كبير، كما حدث تقدم كبير وملموس في مجال الدراسات الوراثية البنيوية، وقد تراكم الكثير من المعلومات عن التتابعات النكليوتيدية للعديد من المجاميع الوراثية وخاصة للكائنات المستخدمة في الدراسات الوراثية كنموذج مثل الرز والـ*Arabidopsis* وأصبحت هذه المعلومات في متناول الجميع، ومع ذلك لا تزال وظائف المورثات المشكلة للتتابعات النكليوتيدية المكتشفة غير معروفة ومحددة بشكل واسع. من أجل ذلك، ومن أجل ملىء الفجوة الكبيرة بين المعلومات المتاحة والمتمثلة بالتباينات النكليوتيدية وبنية المورثات ووظيفتها تم تطوير أبحاث عديدة ضمن ما يعرف باستراتيجية الدراسات الوراثية العكسية، هذا وتلعب الطفرات المحدثة والمؤشرات الجزيئية دوراً هاماً في هذا المجال، إذ أصبح من الممكن وبالاستعانة بتقانة التطفير من الحصول على كائنات مطفرة تملك صفات مختلفة يمكن ردّها إلى هذه الطفرات المحدثة. حيث أصبح من الممكن وبعد عملية غربلة للمجموع الوراثي للكائنات المطفرة ربط الطفرات المكتشفة مع التبدلات الظاهرية للكائن المطفر، وبالتالي ربط الصفات المتبدلة مع المورثات المسؤولة عن ذلك. تم تطوير تقانة استهداف الأضرر الموضعية المحدثة ضمن المجاميع الوراثية الـTILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) والتي تتبع لاستراتيجية الوراثة العكسية من أجل دراسة وظيفة المورثات. تسمح هذه التقانة بعملية غربلـــة سريعة للطفرات المحدثة والأضرار الناتجة عن هذه الطفرات ضمن المورثة أو المورثات الهدف المدروسة، وهي تعتمد في مبدئها على استخدام تقانة الـPCR للكشف عن هذه الطفرات المحدثة ضمن تتالي نكليوتيدي معروف للمناطق أو المورثات الهدف، ومن خلال تحليل التباينات الناتجة لمناطق عدم التطابق المتشكلة مقارنةً مع نفس المناطق لأفراد سليمة غير مطفرة، يتم بعدها تحديد التتالي النكليوتيدي للمنطقة التي تحتوي على الطفرة المكتشفة بهدف تحديد نوع الطفرة. يعمل المطفر المستخدم في هذه التقانة على إحداث سلسلة من الطفرات العشوائية على مستوى المادة الوراثية DNA، قد ينتج عن هذه الطفرات

تغيرات في وظيفة - أو انقاص - في فعالية المورثات التي حدثت فيها هذه الطفرات حسب نوع الطفرات المحدثة.

تم في هذا العمل دراسة جماعة نباتية من صنف الشعير الدنماركي Lux (*Hordeum vulgare* L.) مطفرة باستخدام مادة أزيد الصوديوم (Sodium Azide) بهدف استخدامها في تقانة الـTILLING التي طبقت على أفراد هذه الجماعة النباتية. ولدراسة هذه الجماعة، تم تسجيل أربعة أنماط شكلية مختلفة عند أفراد الجيل الثالث من هذه الجماعة مقارنةً مع الأفراد السليمة غير المطفرة، وبهدف تطبيق خطوات تقانة الـTILLING على هذه الجماعة، تم اختبار العوامل اللازمة والأساسية لنجاح تطبيق هذه التقانة على جماعة الشعير المطفرة، فقد تم تحضير أنزيم القص Cel I المستخدم في مرحلة كشف مناطق عدم المطابقة ضمن هذه التقانة وتنقيته من نبات الكرفس واختبار فعاليته، كما تم اختبار تركيز الـDNA اللازم لتفاعل الـPCR للمورثات الهدف، وكذلك تم تجريب نسب مزج مختلفة من عينات الـDNA بالاستعانة بعينتين من الـDNA تختلفان عن بعضهما البعض بشفع نكليوتيدي واحد ضمن مورثة الديهيدرين *Dhn8*. استخدم جهاز الرحلان الكهربائي LI-COR في معظم الدراسات على جماعات الـTILLING العالمية المطفرة ضمن مرحلة تحليل التباينات النكليوتيدية وفصل قطع الـDNA، وكذلك طبقت تقانة الـDHPLC، بينما تم في هذه البحث دراسة فعالية كشف التباينات النكليوتيدية باستخدام جهاز رحلان ABI PRISM 377 DNA Sequencer. تلى ذلك كشف معدل الطفرات الناتجة عن معاملة الجماعة المذكورة بالمادة المطفرة بغربلة هذه الجماعة مع اثنتين من مورثات الديهيدرين وهما *Dhn12* و*Dhn13*.

أظهرت الدراسات على جماعة الشعير من الصنف Lux المطفرة أن تكرار طفرات اليخضور كان 7% في نسل الجيل الأول و0.9% في نباتات الجيل الثاني، كما تم في هذا البحث تسجيل أربعة أنماط شكلية (عدم إنتاش البذور، طفرات يخضورية، نباتات متقزمة، تبقعات على الأوراق) مختلفة عن النمط الظاهري لنباتات نفس الصنف غير المطفرة، وكانت نسبتها 3.5% في الجيل الثالث. تم اختبار نسب مزج DNA مختلفة (2، 4، 8، 10، 12) وقد أظهرت النتائج أن نسبة المزج 10 (مزج 10 عينات DNA معاً) كانت قادرة على كشف

الطفرات المحدثة، وباستخدام جهاز الرحلان ABI PRISM 377 DNA Sequencer، تم هذا الاختبار على قطع DNA تراوحت في أطوالها من 500 وحتى 800 شفع نكليوتيدي، وقد تم استخدام هذه النسبة لاحقاً مع مورثتي الديهيدرين *Dhn12* و*Dhn13* المطبقتين على جماعة الشعير Lux في هذه الدراسة.

تألفت الجماعة النباتية Lux من 9575 فرد وقد تم غربلة DNA أفراد هذه الجماعة مع مورثتي الديهيدرين *Dhn12* و*Dhn13*. تم تصميم البادئات الخاصة بتقانة الــPCR بحيث تغطي قطعتي DNA وبطول 745 و544 من المورثتين المذكورتين على التوالي. كما تم كشف التباينات النكليوتيدية بتحميل العينات على جهاز رحلان كهربائي ABI PRISM 377 DNA Sequencer. أظهرت النتائج وجود ثلاثة طفرات عند مورثة الديهيدرين *Dhn12* وطفرتين عند مورثة الديهيدرين *Dhn13* ضمن أفراد الجماعة المدروسة. تم تأكيد وجود هذه الطفرات من خلال فحص مزيج عينات الــDNA بشكل افرادي لكل مزيج DNA ايجابي (يحتوي أحد أفراده على مناطق قص ضمن الرحلان الكهربائي). كما تم تحديد التتالي النكليوتيدي لقطع الــDNA التي تحتوي على الطفرات الخمسة المذكورة بهدف تحديد نوع الطفرة المحدثة. أظهرت نتائج الطفرات المكتشفة عند جماعة الشعير Lux أن تكرار الطفرات عند هذه الجماعة كان بمعدل طفرة واحدة لكل 1.5 ميغا شفع نكليوتيدي. كما أظهرت النتائج أن جهاز الرحلان الكهربائي ABI PRISM 377 DNA Sequencer كان مناسباً وذو حساسية جيدة لكشف التباينات النكليوتيدية في مرحلة تحليل الازدواج غير المتجانسheteroduplex analysis ضمن خطوات تقانة الــTILLING.

يمكــن القول أنه تم في هذه الدراسة إثبات خاصية تقانــة الــTILLING في تحديــد التباينات النكليوتيدية، وقد تم إثبات ذلك عنــد اثنتيــن من مورثات الديهيدرين (*Dhn12* و*Dhn13*) الناتجة عن معاملة جماعة الشعير Lux بمادة مطفرة هي أزيد الصوديــوم. كما تم إثبات فعالية استخدام جهاز الرحلان الكهربائي ABI PRISM 377 DNA Sequencer كأداة فعالة وذات حساسية في كشف الطفرات النقطية في جماعات الــTILLING المطفرة. كما تم لأول مرة تطبيق تقانة الــTILLING في كشف التباينات النكليوتيدية عند جماعة الشعير Lux. إن تطفير جماعة نباتية من الشعير ونجاح تطبيق تقانة كشف الطفرات المحدثة

ضمنها يعد عملاً مهماً في مجال الدراسات الوراثية الجزيئية وكذلك في مجال تربية نبات الشعير لتحمل الظروف البيئية المختلفة وغير الملائمة.

1. المقدمة وأهداف البحث

Introduction and Objectives

1.1. مقدمة

تشهد الثورة العلمية في عصرنا الحاضر وتيرة متسارعة لم يعرف لها نظير في تاريخ البشرية، وقد فتحت أبواباً عديدة لحل الكثير من المشكلات المختلفة وأولها تلك المتعلقة بالأغذية والدواء. وفي الوقت الذي تتزايد فيه أعداد سكان الكرة الأرضية وتزداد حاجياتهم للغذاء والدواء والكساء وغيره، فإن الموارد الطبيعية الأرضية والمائية والنباتية والحيوانية تزداد تقلصاً يوماً بعد يوم نتيجة للتدهور والتلوث الناجم عن الاستغلال المفرط، ورغم التكثيف الزراعي المتراكم والاستخدام المتصاعد لوسائل الإنتاج من أنواع محصولية محسنة وأسمدة وغيرها، إلا أن العجز الغذائي لا يزال قائماً، بل أن الفجوة قد تتزايد.

هذا وتعمل البرامج الوطنية بالمشاركة مع البرامج الدولية لتربية النباتات على استخدام التقانات الحيوية الحديثة - ومن ضمنها تقانات استحداث الطفرات - من أجل استنباط أصناف محسنة من المحاصيل الغذائية والصناعية الرئيسية وغير المستغلة بالكامل، والهدف من ذلك هو تحسين الخصائص والصفات الرئيسية الهامة في هذه المحاصيل، وعلى الإسراع بتربية أصناف محاصيل جديدة بزيادة كفاءة استحداث الطفرات وفعالية اختيار عوامل الطفرة باستخدام الواسمات (المؤشرات) الجزيئية (molecular markers)، وقد انتقل التركيز في السنوات الأخيرة من مرحلة استنباط أصناف ومواد نباتية ذات إنتاجية أعلى ومقاومة أفضل إلى مستوى بحثي أعلى من أجل التعرف على ماهية المورثات وانتقائها وتوصيفها من خلال البصمات الوراثية الجزيئية (genetic fingerprinting) وغير ذلك من الأساليب البيولوجية (الإحيائية) الحديثة.

هذا ويتم تنفيذ هذه البرامج من خلال توجّهين رئيسين، الأول باستخدام التنوع الحيوي المحدث من أجل تربية النباتات مع زيادة التأقلم مع الظروف البيئية غير المناسبة كالجفاف والملوحة وغيرها من العوائق والاجهادات البيئية (لا إحيائية)، أما الثاني فمن خلال التعرف على المورثات ومعرفة آلية عملها وتوصيفها ونقلها. وإذا كان التوجه الأول يركز على

طرائق وتقانات معينة لاستحداث الطفرات وانتقاء عوامل الطفرة والأصول الوراثية (germplasm) المطفرة التي تتمتع بخصائص محصولية مهمة، فإن الأخير يهدف إلى وضع خرائط المورثات والمورثات الموصفة جزيئياً كما يهدف إلى استخدام الطفرات كذلك من أجل دراسة وفهم آلية عمل المورثات.

بشكل عام يمكن القول إن برامج تربية النباتات ودراسة صفاتها الوراثية تصبح قوية وفاعلة باستخدام الطفرات المحدثة وكذلك باستخدام التقانات الجزيئية التطبيقية بما في ذلك الواسمات الجزيئية واستخدامها في توصيف طفرات الأصل الوراثي، وهي تؤدي غرضاً مفيداً جداً في مساعدة البلدان النامية على استنباط أصناف جديدة من خلال تقانات الطفرات المحدثة وفي تقديم التدريب والخدمات للمزارعين، وهذا واضح من الأصناف العديدة التي أمكن استنباطها من مختلف المحاصيل بفضل استحداث الطفرات.

تسمح تقانات توليد الطفرات في الموقع الطبيعي باحداث تغيرات في المورثات داخل النباتات وبالتالي تقضي على المشاكل المرتبطة بإدخال مورثات جديدة في مواقع قد تكون غير مناسبة في الصبغيات، ناهيك عن الصعوبات والمشاكل الكثيرة المرافقة لعمليات النقل المورثي (genetic transformation). هذا ويعتبر التطفير الموجه نحو الموقع من الاستراتيجيات الحديثة والمستقبلية الواعدة التي يمكن استخدامها لأهداف عدة، وقد ظهرت في السنوات القليلة الماضية تقانات مبتكرة لدراسة المورثات ولفهم أكبر لآلية عملها من خلال ما يسمى بدراسة المورثات بطريقة عكسية (استراتيجية الوراثة العكسية reverse genetic strategies) وفيها يتم استخدام مطفرات محددة بغية إحداث طفرات عشوائية على مستوى المجموع الوراثي للنبات الهدف وذلك بهدف الحصول على أفراد تحتوي على طفرات ضمن المورثة أو المورثات الهدف المدروسة والتي قد تعكس تغيراً في تركيب الحموض الأمينية المعدّلة نتيجة الطفرات المحدثة، وعليه يمكن لاحقاً مقارنة هذه الأفراد التي تحتوي على طفرات نقطية في الموقع الهدف مع الأفراد السليمة غير المطفرة ومقارنة التغير الحاصل سواءً على المستوى الشكلي (المورفولوجي) أو الفيزيولوجي أو الوظيفي.

2.1. أهداف البحث Objectives

يهدف هذا البحث إلى:

1. دراسة جماعة الشعير من الصنف Lux المطفرة باستخدام مادة أزيد الصوديوم Sodium Azide، (وهي احدى المطفرات الكيميائية التي تُحدث طفرات نقطية عشوائية على مستوى الـــDNA).
2. اختبار قابلية تطبيق تقانة الـــTILLING، وهي تقانة استهداف الأضرار الموضعية المحدثة ضمن المجاميع الوراثية (TILLING technique) على هذه الجماعة.
3. تطوير إستراتيجية عمل لعزل المادة الوراثية DNA من جماعة الشعير المدروسة والكبيرة العدد نسبياً، بهدف استخدامها فيما بعد في تقانة الـــTILLING.
4. تحديد نسبة المزج الأمثل لعينات الـــDNA (DNA pools) المستخدمة في تقانة الـــTILLING ليتم استخدام هذه النسبة لاحقاً مع جميع المورثات المدروسة ضمن جماعة الشعير Lux
5. تحديد تركيز وفعالية أنزيم القطع Cel I (المستخلص من نبات الكرفس) الأنسب واللازم لكشف التباينات المفردة في مرحلة تحليل الازدواج غير المتجانس Heteroduplex ضمن خطوات تقانة الـــTILLING
6. تطبيق تقانة الكشف عن التباينات المفردة ضمن خطوات تقانة الـــTILLING باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem)
7. اختبار معدل التطفير الناتج عن استخدام مادة أزيد الصوديوم على جماعة الشعير المدروسة (كثافة الطفرات Mutation density ضمن هذه الجماعة) بتطبيقها على اثنتين من مورثات الديهيدرين عند الشعير

2. الدراسة المرجعية

Literature Review

أدى إتمام تحديد التتابع النكليوتيدي Sequences للحمض النووي المنقوص الأكسجين DNA لعدد من الكائنات الحية وتحديد مورثاتها إلى توفر فائض من المعلومات عـــن هذه التتابعات قادت إلى الانتقال من أبحاث تحديد وتحليل التتابعات النكليوتيدية للمجموع الوراثي لهذه الكائنات إلى أبحاث أكثر تقدماً كتلك التي تقود إلى فهم آلية عمل ووظيفة المورثات المكونة من هذه التتابعات، وقد تمّ التركيز على ما يمكن تسميته بدراسة مجموع العوامل الوراثية الوظيفية (functional genomics)، وقد أدى هذا بشكل واسع إلى تضمين العديد من المساعي بهدف تحديد وظائف المورثات على مستوى المجموع الوراثي (Genomes) ككل عند هذه الكائنات (Ausubel and Benfey 2002).

تفيد عمليات مقارنة التتابعات النكليوتيدية (Sequence Alignments) بين مختلف الأنواع والأجناس في تحديد درجة القرابة بين وضمن أنواع وأجناس الكائنات الحية، هذا ويتم تحديد التتابعات النكليوتيدية باستخدام طرق وتقانات معروفة ومحددة، في حين تستخدم تقانات مختلفة من أجل تحديد نماذج التعبير المورثي gene expression profiles، بعض هذه التقانات يعتمد على طرق التهجين الثنائي للخميرة yeast two-hybrid وعلى تحاليل بينية (interaction analyses) أخرى وقد استخدمت هذه التقانات بنجاح لتحديد المسارات الممرضة (المسببة للأمراض) pathways، والشبكات Networks والمعقدات البروتينية protein complexes. تعوّل جميع هذه التحاليل والدراسات على تقانات ذات كفاءة إنتاجية عالية high-throughput والتي يمكن أن تطبق – تقريباً – على أغلب الكائنات الحية بغض النظر عن طبيعة الكائن، طالما أن التتابع النيكلوتيدي متاح وكافٍ (Roy *et al.*, 2002).

1.2. الوراثة العكسية

Reverse Genetic

تعد كثير من الطرق والتقانات المذكورة واعدة لاستكشاف وظيفة المورثة، ولكنها تظل غير فعّالة إلى الحد المطلوب أو المرجو منها على اعتبار أنها تكشف ميزات مهمة فعلاً في المورثة ولكنها لا تكشف دور المورثة ضمن سياق الكائن الحي. إن تقانات كهذه تشكل المحور الأساسي لاستراتيجيات الأبحاث الوراثية المعززة (الأمامية أو المباشرة) forward

genetic التقليدية (Muller, 1930 وStadler, 1932)، في حين بدأ يظهر محور جديد في هذا المجال يعتمد طرق التطفير المختلفة والمتبوعة بفحص التغيرات الشكلية phenotypic screen والمورفولوجية الناتجة عن التغيرات المحدثة بفعل المطفرات والتي غالباً ما تكون مؤثرة على مستوى جزيئي، وتؤدي في النهاية لإيجاد وظيفة المورثة وتحديد هويتها. يندرج هذا النوع من التقانات تحت استراتيجيات الأبحاث الوراثية العكسية reverse genetic، فاستراتيجية هذا النوع من التقانات تعتمد على إحداث ضرر أو عطب في المورثة أو المورثات المدروسة ثم دراسة التغير الحاصل للفرد المطفر مقارنةً مع الفرد السليم غير المطفر، وهي تعتمد بشكل أساسي على المعرفة المسبقة للتتابعات النكليوتيدية للمورثات الهدف المراد معرفة وظيفتها، إذ تتم مقارنة التتابع النكليوتيدي الجديد الناتج عن طرق التطفير المستخدمة في هذا النوع من التقانات (سواءً كان التطفير موجه أو غير موجه) مع التتابع النكليوتيدي الأصلي للمورثة الهدف المدروسة، ثم الانتقال لدراسة التغيرات الظاهرية والوظيفية الناتجة عن الطفرات المحدثة في المورثات الهدف.

على خلاف الأدوات المستخدمة في الطرق الكلاسيكية لتوصيف المورثات والتي هي غير متاحة التطبيق على جميع الكائنات الحية فإن استراتيجيات الطرق الوراثية العكسية هي أدوات فعّالة وقابلة للتطبيق عموماً على مختلف الكائنات الحية، وبسبب قصر الأدوات الكلاسيكية عن التطبيق على العديد من الكائنات الحية، فقد شهد عصر استخدام الأدوات الكلاسيكية فجوة جدية بين ما تم معرفته من تتابعات نكليوتيدية وبين معرفة خصائص ووظائف المورثات المكونة من هذه التتابعات، وقد ظهرت هذه المشكلة بشكل أكبر وأوضح عنـد النباتات، فهنا الفجـوة واسعة بشكل خاص، ليس فقـط بين النباتات الأعلى والأدنى علـى اعتبار أن هذه الأخي‌رة يمكن تحوريها وراثياً بسهـولة أكبر مثل الخميرة، ولكن أيضاً بين النباتات التي تستخدم كنموذج model مثل الـ*Arabidopsis* والرزّ Rice (Goff et al., 2002 وYu et al., 2002) وبين بقية النباتات والتي تشكل الغالبية العظمى، إذ أن الغالبية العظمى من الدراسات المذكورة تركّز على النباتات التي تستخدم كنموذج وذلك لأسباب عديدة، منها قصر دورة الحياة مما يجعل إجراء التصالبات والحصول على أجيال نقية (متماثلة اللواقح) سريعاً، كما أنها أحادية المسكن ثنائية الجنس، والنبات صغير الحجم مما

يوفر المساحات اللازمة للزراعة ويقلل الكلفة اللازمة لإجراء الأبحاث عليها، وكذلك صغر حجم المجموع الوراثي لها (Genome) مما يسهل التعامل مع المادة الوراثية (DNA وRNA)، ولكن هذه النباتات هي في الغالب غير مهمة غذائياً أو اقتصادياً. يعتبر حالياً تطبيق استراتيجية الوراثة العكسية على النباتات التي لا تستخدم كنموذج nonmodel من الأولويات القصوى، وخاصة نباتات المحاصيل إذ تعتبر دائماً الأبحاث والدراسات على هذه المحاصيل مطلــوبة بشكل خاص بسبب الأهمية الاقتصادية والإنمائيــة لهذه المحاصيل وبهدف تطوير الهندسة الوراثية المحسنة والواعدة لمتابعة مشروع الثورة الخضراء (Khush, 2001).

توجد الآن طرق أو تقانات متاحة من أجل الدراسات الوراثية العكسية فــي النباتات، وعادةً ما تستخدم في هذه الطرق مطفرات تقليدية مختلفة (كيميائية، إشعاعية)، هذه المطفرات قادرة على إحداث طفرات نكليوتيدية (مفردة أو متعددة) عشوائية ومتوزعة على طول المجموع الوراثي genome للكائن المطفر ومعطيةً سلسلة من النظائر الطافرة، وقد تعكس هذه الطفرات النكليوتيدية تبدلات في الحموض الأمينية أو البروتين الناتج عن الترجمة إذا ما حدثت ضمن مناطق التشفير (حسب نوع وموقع الطفرة) وبالتالي تنعكس هذه الطفرات على شكل تبدلات أو تباينات ظاهرة على الفرد المطفر، وهذه الطرق لتحديد الطفرات المحدثة قابلة للتطبيق للكشف عن تباينات النكليوتيدات المفردة Single nucleotide polymorphism SNP وتباينات النمط الوراثي genotyping (Henikoff and Comai, 2003).

2.2. استراتيجيات الوراثة العكسية لدراسة المجاميع الوراثية وظيفياً عند النبات

Reverse-Genetic Strategies for Plant Functional Genomics

تصنف الطرق المستخدمة في الدراسات الوراثية العكسية ضمن مسارين عامين اعتماداً على هدف التطفير، الأول لتحديد فيما إذا كان التطفير mutagensis يستهدف بشكل محدد المورثة أو الموقع المورثي المدروس، والثاني لتحديد فيما إذا كان التطفير يتم بشكل عشوائي على جميع أجزاء المجموع الوراثي genome، يتبع ذلك في كلتا الحالتين عملية

بحث أو غربلة screen للطفرات المحدثة من أجل كشف الضرر الوراثي والوظيفي الناتج عن عملية التطفير هذه بكلا نوعيها، هذا ولكل مسار ميزاته وصعوباته.

1.2.2. الاستهداف المحدد للموقع

Targeting Specific Loci

يعتبر هذا النوع من الأبحاث (الاستهداف المحدد للموقع المورثي) مهم وفعّال ويستخدم عندما تكون المورثات الهدف المراد دراستها قليلة العدد، وقد أصبحت طرق الاستهداف في النباتات، مثل تقانة Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS) شائعة بل ومستخدمة بشكل كبير ومتزايد (Waterhouse, 1998 و Chuang and Meyerowitz, 2000)، (ملحق 1) وقد تم تطوير هذه الطرق للاستعاضة بها عن طرق أخرى سابقة أقل موثوقية مثل طريقة antisense suppression، (ملحق 3).

يتم في طريقة antisense suppression تصميم قطع متممة للـــmRNA المراد تثبيط عمله، إذ ترتبط هذه القطع مع الـــmRNA مما يحول دون عملية الترجمة)، (Schuch, 1991) وكانت قد استخدمت لسنين طويلة. كما أن لهذه الطرق والتقانات (مثل PTGS) أفضلية على النظام الطبيعي المسمى RNA interference (RNAi) فقد تم كشف هذا النظام الطبيعي عند معظم حقيقيات النوى، وقد طور العلماء تقانة PTGS اعتماداً على مبدأ RNA interference الموجود بشكل طبيعي عند هذه الكائنات وذلك بهدف تطبيقه على مورثات غير مرغوب فيها (كالمورثات المرضية والسرطانية وغيرها). إذ يتم في النظام المذكور معاملة (تقطيع) شريط الـــRNA المضاعف ليصار إلى قطع بطول 22 -25 شفع نكليوتدي لكل قطعة (Baulcombe, 2002 و Vaucheret et al., 2001)، يمكن بعدها لهذه القطع الصغيرة أن تنتشر خارج الخلايا ومن خلال الثغرات البلاسمية (plasmodesmata) والجهاز الوعائي إلى خلايا أخرى. تستهدف هذه القطع الصغيرة من الـــRNA ذو الشريط المضاعف نسخ مشابهة أو مكملة لها حتى أنها يمكن أن تستهدف المورثات مـــن أجـــل استقلاب الـــDNA (Chuang and Meyerowitz, 2000)، هذا علماً أن كثير من التقارير قد أظهرت أن نجاح هذه الطريقة كان مشجعاً، ولكن مع ذلك تبقى

مشكلة هذا النظام أن كفاءة الإسكات silencing يمكن أن تتفاوت من كائن إلى آخر وحتى ضمن نفس الكائن، ولذلك فقد تكون نتائجها متقلبة. كما أن الاعتماد على هذه النظام يعوزه تصميم خاص لكل مورثة هدف ومن ثم نقلها وبشكل مفرد إلى النبات الهدف. إن تقانة PTGS يمكن أن تكون أفضل طريقة لاستهداف مورثات متعددة ووثيقة الصلة بالمورثات العائلية، (ملحق 2).

تستخدم أيضاً ضمن إستراتيجية تطفير الموقع الهدف تقانة إعادة الارتباط المتكافئ Homologous recombination، وهي مرغوبة بشكل كبير في هذا المجال، وقد أصبح استخدام هذه التقانة يتم بشكل روتيني عند بعض المتعضيات الجرثومية مثل الـ*E.coli* والخمائر (Struhl *et al.*, 1979). مع أن هذه التقانة قد استخدمت لعقود إلا أنها لا تزال حتى الآن بعيدة وغير قابلة التطبيق عند حقيقيات النوى، مع وجود بعض الاستثناءات عند بعض الكائنات المستخدمة كنموذج models متضمنة الثدييات (Capecchi, 2000) والبعــوض (Rong and Golic, 2000) وكذلك الطحالب *Physcomytrella* (Schaefer, 2001)، ومع ذلك تظل هذه التقانة غير عملية وغيرقابلة للتطبيق بشكل واسع وفعّال على عدد كبير من المتعضيات (Wang et al., 2001).

من ضمن الاستراتيجيات المستخدمة في هذا المجال أيضاً تقانة chimeric RNA/DNA hybrid oligonucleotides، إذ يمكن الاعتماد على هذه التقانة في استهداف مواقع مورثية معينة. يتم في هذه التقانة توليــد تغيرات (تبديل أو إدخال أو حذف) في الأسس النكليوتيدية للموقع الهدف، ولكن على الرغم من أن هذه التقانة تملك تطبيقات واسعة إلا أنها لا تزال بحاجة إلى إثبات فعّالية (جدوى) تطبيقها بشكل واسع (Rice et al., 2000).

2.2.2. التطفير الواسع المجال للمجموع الوراثي والغربلة

Genome-Wide Mutagenesis and Screening

تمتلك استراتيجية التطفير الواسع المجال للمجموع الوراثي أفضلية على استراتيجية الاستهداف المحدد للموقع السابقة على اعتبار أنها مناسبة وقابلة للتطبيق على عدد كبير من

الكائنات الحية وهي تندرج ضمن الأبحاث الوراثية العكسية. تعتمد هذه الإستراتيجية على تطفير جماعة population إحيائية معينة (كجماعة نباتية للقمح أو الشعير مثلاً) ثم عزل الــDNA لأفراد هذه الجماعة، كما يتم الاحتفاظ بنسل هذه الجماعة (بذور مثلاً) للاستعمال لاحقاً أو فيما بعد في دراسة التغير الظاهري الناتج عن هذه الطفرات. تكون إمكانية التطفير وإجراء الأبحاث الوراثية العكسية في هكذا نوع من التقانات مناسبة ومتاحة من أجل أي مورثة، فعلى سبيل المثال استخدم أسلوب التطفير المدخل insertional mutagenesis على نبات الــ*Arabidopsis* بشكل واسع وبوساطة استخدام تقانة T-DNA أو عناصر النقل transposable elements (http://www.Arabidopsis.org/links/insertion.html)، مع عملية عزل لاحق للــDNA، من أجل الغربلة وتخزين البذور من جماعات (عشائر) نباتية كبيرة العدد نسبياً تضم عشرات الآلاف من النباتات المطفرة والتي يحتوي القليل منها على المدخلات insertions المطفرة الهدف، وقد تمكن الباحثون وعن طريق تحديد التتابع النكليوتيدي للمناطق المحيطة للمدخلات في عدد كبير من المجاميع الوراثية عند نبات الــ*Arabidopsis* من إيجاد الطفرات بشكل كامل في وسط غذائي صنعي (silico) وذلك ضمن المورثات الهدف. وقد سهلت تقانة insertional mutagenesis بشكل كبير وعملي انتخاب أو التقاط الطفرات knockout mutations لعدد من المتعضيات. قد ينتج عن فقد أجزاء أو كسر أساسية من المورثات (قطع الــ DNA) نقص أو تغير في الصفة التابعة للبروتينات المنسوخة والمترجمة من هذه المورثات المنقوصة، أو قد ينتج عنها صفات غير كاملة أو انحراف في الموقع المورثي المدخل (Krysan et al., 2002).

على الرغم من اعتماد الباحثين العاملين على نبات الــ*Arabidopsis* (المستخدم كنموذج model) في هذه التقانة بشكل كبير، إلا أنها تظل غير كافية وغير ملبية لمتطلبات العديد من المدخلات المستخدمة في دراسات نباتية أخرى. ففي الرز على سبيل المثال استخدمت مدخلات *Tos-17* transposon في الأبحاث الوراثية العكسية، ولكن انحراف مواقع الإدخال المهمة (ذات المعنى) والمستوى المرتفع لطفرات *Tos-17* transposon أدى إلى إرباك في تحليل النمط الشكلي اللاحق (Yamazaki et al., 2001)، كما أن هذه التقانة تحتاج لعملية زراعة نسيجية Tissue culture وهي أيضاً ضرورية من أجل تحوير الرز

Rice transformation وهذه النباتات المطفرة يمكن أن تكون مصدراً للطفرات (Hirochika, 1997). يمكن تطبيق الزراعة النسيجية على كل من نبات الــ*Arabidopsis* ونبات الرز وإجراء العديد من التحويرات وهي عند هذين النباتين تعتبر عملاً روتينياً وسهلاً (Bechtold and Pelletier, 1998)، ولكن ليست كذلك عند الغالبية العظمى من النباتات وبالتالي فإن تطبيق تقانة التطفير المدخل على العديد من النباتات هي مهمة صعبة وغير قابلة للتطبيق بشكل واسع، كما أن تطبيقها على العديد من النباتات يحتاج إلى تعديل وتحوير في هذه التقانة بحيث يتم تجنب الزراعة النسيجية لتصبح أكثر كفاءة وعملية من أجل العديد من النباتات.

أمام الصعوبات السابقة المذكورة كان لابد من البحث عن طرق أكثر فاعلية وشمولية في التطبيق، ولحسن الحظ، تم إيجاد طرق تطفير إضافية في هذا المجال (أبحاث الوراثة العكسية) وهي تعتمد إما على الإشعاع المؤين ionizing radiation أو المطفرات الكيميائية chemical mutagens والتي غالباً ما تكون مفيدة في النباتات، وقد طبق كلاً من هذين النوعين من المطفرات بنجاح على عدد من النباتات في الدراسات الوراثية العكسية. من مزايا هذا النوع من التطفير أنها لا تعتمد على استخدام تقانة النقل المورثي Genetic transformation، التي تعتبر مكلفة وغير سهلة التطبيق على جميع المحاصيل، كما أنه لا يزال يوجد الكثير من الجدل حول النباتات المعدلة وراثياً (التي يتم نقل مورثات إليها من أنواع أو أجناس أخرى) وقبول فكرة التحوير الوراثي. استخدمت أيضاً في هذا المجال تقانة القذف أو الإطلاق السريع للنيترونات fast neutron من أجل تطفير جماعات في الرز والــ*Arabidopsis* (Li *et al.*, 2001). لكشف الطفرات الناتجة عن هذه الطريقة (حذف مورثة Delete-a-gene)، يتم فيها أو بعدها الاستعانة بتفاعل سلسلة بلمرة الــDNA (PCR) لتضخيم قطع الــDNA الهدف الممزوجة ضمن مجمعات pools ثم تمرير العينات المضخمة الناتجة على جهاز رحلان كهربائي لفصل القطع المضخمة والتي يمكن عن طريقها كشف الطفرات الناتجة (وهي غالباً ما تكون على شكل حذوفات) في قطع الــDNA الهدف المضخمة، إذ غالباً ما يؤدي التطفير المستخدم في هذه التقانة إلى حذف في مناطق مختلفة من المجموع الوراثي (حذف عشوائي لمناطق مختلفة الحجم على طول شريط الــDNA المكوّن

للمجموع الوراثي) للكائن الهـدف المعامل وهـذه الحذوفات تكون مختلفة، تتراوح عادةً من 1 حتى 5 كيلو أساس قاعـدي أو نكليوتيدي، يمكن بعد ذلك كشفها بسهولة على وسط الرحلان الكهربائي حتى في مجمع pool مؤلف مـن 1000 عينة (Jansen *et al*., 1997 وLi *et al*., 2001)، ثم يلي ذلك غربلة هذه الطفرات وانتخاب المفيد منها. تعتبر هذه التقانة مفيدة جداً في حالة دراسة المورثات المتكررة الترادفية tandemly repeated genes، والتي هي شائعة عند النباتات (Achaz *et al*., 2001). علماً أن نجاح أية تقانة في هذا المجال مرتبط بكونها قابلة للتطبيق على عدد كبير من الكائنات.

تم تطوير تقانة استهداف الأضرر الموضعية المحدثة ضمن المجاميع الوراثية TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes)، من قبل كل من الباحثين Steven Henikoff وLuca Comai في مختبر للأبحاث السرطانية في الولايات المتحدة الأمريكية (McCallum et al. 2000). تسمح هذه التقانة بعملية غربلة سريعة للمورثات المدروسة بهدف الكشف عن الطفرات المحدثة، وتعتمد إستراتيجيتها على عملية غربلة بوساطة تفاعل الـPCR ضمن مناطق الـDNA (المورثات الهدف)، معروفة التتابع النكليوتيدي لتحديد اختلافات مناطق التشفير الناتجة عن عملية التطفير المستخدم في هذه التقانة والتي بدورها تدل على مكان ونوع الطفرة المحدثة. تُحدث المواد المطفرة المستخدمة في هذه التقانة مجموعة من الطفرات النقطية العشوائية الموزعة على امتداد DNA المجموع الوراثي للفرد المدروس (Henikoff and Comai 2003).

3.2. التطفير والطفرات

Mutagenesis and Mutations

إن الطفرات هي عبارة عن تغيرات في تتابع الأزواج القاعدية المشكلة للمادة الوراثية (DNA) (تبديل أو إدخال أو حذف). يمكـن أن تحدث هذه التغيرات (الطفرات) نتيجة أخطاء أثناء نسخ المادة الوراثية خلال انقسـام الخلايا وكذلك نتيجة التعرض للأشعة فوق البنفسجية أو الإشعاعات المؤينة أو المطفرات الكيميائية أو الفيـروسات، أو خلال عمليات

الانقسام المنصف وغيرها (Bertram et al., 2000 وAminetzach et al., 2005 وBurrus and Waldor, 2004).

يمكن أن ينتج عن الطفرات عدة أنماط من التغيرات في التتابع النكليوتيدي للـــDNA، وهـــذه التغيرات إما أن تؤثر على بنيـــة المورثة التي يحـــدث بها التغير (الطفرة) وبالنتيجة على وظيفة المورثة بشكل كامل أو جزئي أو قد لا تؤثر على وظيفتها، (Hastings et al., 2009 وCarroll et al., 2005 وHarrison and Gerstein 2002). أظهرت التجارب التي أجراها العلماء على ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster* بأن الطفرات التي تبدل أو تغير في المنتج البروتيني المترجم من المورثة الطافرة، تكون نسبة 70% منها ذات تأثير ضار في حين أن النسبة المتبقية 30% من الطفرات تكون إما ذات تأثير محايد أو ضعيف، (Sawyer et al., 2007)، وعلى أية حال فقد أظهرت الدراسات على الخميرة yeast بأن نسبة 7% من الطفرات خارج مناطق المورثات كانت ضارة، (Doniger et al., 2008)

وقد طورت المتعضيات آلية إصلاح DNA repair تجاه الضرر الذي يحدث نتيجة الطفرات، تعمل هذه الآلية على إزالة أو إصلاح الطفرات، (Bertram et al., 2000)، كما أن هناك تفاضل بين معدل الطفرات التي تحدث وبين معدل إصلاح تلك الطفرات بوساطة أنزيمات الإصلاح DNA repair enzymes، إذ أنه في بعض الأحيان يكون معدل الطفرات أكبر من معدل إصلاحها بوساطة النظام المذكور (Sniegowski et al., 2000).

يمكن تقسيم الطفرات عند المتعضيات المتعددة الخلايا إلى طفرات في الخلايا الجنسية، وهذه يمكن أن تنتقل إلى الأبناء، وطفرات جسمية somatic mutations وهي التي تحدث أو تنشأ في الخلايا الجسمية والتي يمكنها أن تنتج خلايا مماثلة للخلية التي حدثت بها الطفرة ولكنها لا تنتج كائناً كاملاً وبذلك فالتغير الوراثي سيكون ممثلاً فقط في الخلايا الجسمية الناتجة عن الخلية التي حدثت بها الطفرة، إن النباتات في بعض الأحيان يمكن أن تنقل بعض الطفرات الجسمية إلى نسلها بدون تزاوج asexually أو جنسياً sexually (في حالة تطور البراعم الزهرية التي تحتوي على الطفرات إلى نبات كامل، فقد تشمل الطفرة كل

نسيج الفرع النامي إذا حدثت في مرحلة مبكرة من نمو البرعم ويؤدي ذلك إلى إحتواء كل خلايا البرعم على هذه الطفرات فتظهر في جميع خلاياه، وهو ما يعني انتقالها لاحقاً إلى النسل الناتج عن هذا الفرع الطافر)، (Ionov et al., 1993).

تحـــدث الطفـــرات اختلافات في المجمع المـــورثي (gene pool)، والطفـــرات الأقل تفضيلاً (المؤذية deleterious) يتـــم استبعادها من مجمـــع المورثات بوساطة الانتخـــاب الطبيعي natural selection، بينما الطفـــرات الأكثر تفضيلاً (المفيدة beneficial or advantageous) عادةً ما تتراكم وتحدث بالنتيجة تغيرات تطورية. إن الغالبية العظمى من الطفرات يتم تعديلها (إصلاحها) بوساطـــة آلية إصلاح الـــDNA (DNA repair)، إن لهذه الآلية قدرة على إصلاح معظم التغيرات قبل أن تصبح تغيرات دائمة، وتملك متعضيات عديدة آليات أخرى لإزالة تحولات الخلايا الجسمية المطفرة permanently mutated somatic cells، (Hurst and Werren 2001).

1.3.2. أسباب الطفرات

هناك فئتين من الطفرات حسب مسبب الطفرة، هما:

- الطفرات العشوائية spontaneous mutations.
- والطفرات المُحدثة induced mutations تنتج عن مطفرات mutagens.

1.1.3.2. الطفرات العشوائية: يمكن أن تحدث هذه الطفرات على المستوى الجزيئي بشكل عشوائي وتقسم إلى:

Tautomerism: تغير يحدث في الأساس القاعدي عن طريق إعادة توضّع ذرة الهيدروجين وتغير الرابطة الهيدروجينية لذلك الأساس مم يؤدي إلى ارتباط غير صحيح لهذا الأساس خلال عملية التضاعف في شريط الـــDNA.

Depurination: فقدان الأساس القاعدي البيوريني (أدينين أو غوانين) لينتج عنه تشكيل موقع غير بوريني apurinic

Deamination: تبدل في حلمهة الأساس القاعدي لينتج عنه أساس غير نظامي يحتوي مجموعة keto في مكان مجموعة الحمض الأميني الأصلية. مثال ذلك تحول السيتوزين C إلى يوراسيل U وتحول الأدنين A إلى HX (هيبو كسانتين hypoxanthine) والتي يمكن إصلاحها بوساطة آلية إصلاح الـــDNA

Slipped strand mispairing: وفيها يتم إنفصال شريطي الـــDNA عن بعضهما خلال عملية التضاعف يليها إعادة التحام للشريطين في مكان آخر، ينتج عن هذا النوع طفرات حذف أو إدخال.

2.1.3.2. الطفرات المحدثة: تسبب هذه الطفرات على المستوى الجزيئي كلاً من:

1.2.1.3.2. المواد الكيميائية Chemicals: تسبب العديد من المواد الكيميائية طفرات وبأشكال مختلفة، (Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007)، ومنها:

- (NTG) Nitrosoguanidine
- NH_3OH Hydroxyamine
- مشابهات القواعد Base analogs (مثل 5-bromouracil و2-aminopurine)
- بعض المواد الكيميائية البسيطة (مثل الأحماض acids)
- عوامل الألكلة أو العوامل القلوية Alkylating agents (مثل *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU))
- عوامل المتيلة Methylating agents (مثل ethyl methansulfonate (EMS))
- Polycyclic hydrocarbons (مثل benzopyrenes الموجود في عوادم السيارات (internal combustion engine exhaust))

- ß DNA crosslinker (مثل platinum)
- ß أضرار الأكسدة المسببة بوساطة جذر الأكسيجين oxygen (O) radicals

2.2.1.3.2. الإشعاع Radiation، (Kozmin et al., 2005)

يعد الإشعاع من أهم العوامل المطفرة، حيث تُحدث الأشعة فوق البنفسجية وعدد من الأشعة ذات أطوال موجية معينة طفرات في الكائنات الحية التي تتعرض لها، وتقسم الأشعة حسب طريقة تأثيرها إلى:

- ß الأشعة غير المؤينة (مثل الأشعة فوق البنفسجية): تهيج الأشعة فوق البنفسجية الالكترونات إلى مستوى طاقة أعلى، هذا وتمتص الـــDNA شكل واحد من أشكال الضوء فوق البنفسجي. إن السيتوزين والتيامين من الأسس النكليوتيدية في الـــDNA الأكثر حساسية للتهيج نتيجة الأشعة الذي يمكن أن يغير صفات الأساس القاعدي base-pairing properties. يمكن أن تشكل الأشعة فوق البنفسجية أسس تيامين مجاورة في شـــريط الـــDNA لتتزاوج مـــع بعضها مشكلة متعـــدد تيامينـــي bulky dimmer.
- ß الإشعاعات المؤينة (مثل أشعة غاما وأشعة بيتا وأشعة X والنيترونات): تعتبر النظائر المشعة من أهم مصادر الإشعاعات المؤينة. تملك الـــDNA ما يسمى بالنقاط الساخنة hotspots، حيث تظهر الطفرات فيها بتكرار أكبر بـــ100 مرة من معدل الطفرات الطبيعي. يمكن أن يتكوّن عند هذه النقاط أو المناطق الساخنة أسس قاعدية غير طبيعية، مثل 5-methylcytosine.

3.2.1.3.2. الإصابات الفيروسية: تسبب الإصابات الفيروسية أنواع مختلفة من الطفرات حسب نوع الفيروس وطبيعة الإصابة، (Pilon et al., 1986)

2.3.2. تصنيف الطفرات Mutation Classification

هناك تصنيفات متعدد للطفرات اعتماداً على طبيعة الطفرات وأسبابها ونتائج حدوثها وغيرها، ويمكن تصنيفها وفق الآتي:

1.2.3.2. الطفرات التي تؤثر على بنية المورثة

By aspect of structure affected

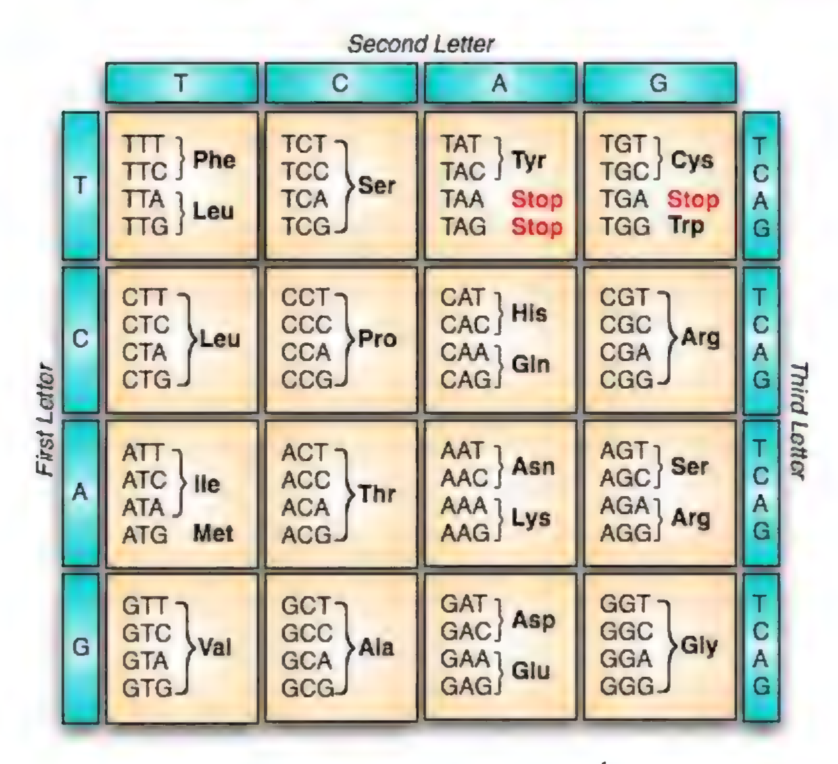
تختلــف الآثار الناتجة عن الطفرات الوراثيــة اعتماداً على مكان ظهــورها وفيما إذا كانت تبــدّل أو تغير في الوظيفــة الأساسيــة للبروتينــات، (Freese, 1959a وFreese, 1959b). اعتماداً على التغيرات البنيوية (التركيبية أو الهيكلية)، يمكن تصنيف هذه الطفرات على النحو التالي:

1.1.2.3.2. Small-scale mutations: الطفرات التي تؤثر على واحد أو عدد قليل من النكليوتيدات ، وهي تتضمن:

- **الطفرات النقطية Point mutations:** غالباً ما تسببها المواد الكيميائية أو خلل في تضاعف الــDNA، مثل استبدال transition نكليوتيد مفرد بآخر. إن الأكثر شيوعاً في استبدالات كهذه، هي إما استبدال بيورين ببيورين آخر (استبدال أدينين مع غوانين أو العكــس A ↔ G)، أو استبدال بيريميدين ببيريميدين آخر (استبدال سيتوزين مع تيامين أو العكس C ↔ T). الاستبدال أو الانتقال يمكن أن يسببه حمــض النيتريك، أو عوامل base mispairing (مثل BrdU). بشكل أقل شيوعاً نجد الطفرات المستعرضة transversion، والتي يتم فيها استبدال بيورين ببيريميدين أو العكس (A/G ↔ C/T). يمكن للطفرات النقطية أن تكون معكوسة مع طفرات نقطية أخرى، حينما يكون النكليوتيد قد تم استبداله ليعود لوضعه الأصلي (true version)، أو by second-site reversion (طفرة متممة في مكان آخر وتكون نتيجتها إعادة ربح المورثة لوظيفتها). تصنف هذه التغيرات أو الطفرات علــى أنها تحولية transitions أو استبدالية transversions. وكمثال عنها، أي الأخيرة

هــو تحول الأدنين (A) إلى سيتوزين (C). كما توجــد أمثلة أخرى كثيرة على ذلك، .(Freese, 1959b)

يمكن تقسيم الطفرات النقطية التي تظهر في منطقة تشفير البروتين في المورثة إلى ثلاثة أنواع اعتماداً على شفرة الكودون (الثلاثية)، على اعتبار أن الحموض الأمينية المشكلة للبروتينات يمكن أن تشفر بأكثر من شفرة كودون واحدة (شكل 1).



Second Letter

First Letter	T	C	A	G	Third Letter
T	TTT } Phe TTC TTA } Leu TTG	TCT } Ser TCC TCA TCG	TAT } Tyr TAC TAA Stop TAG Stop	TGT } Cys TGC TGA Stop TGG Trp	T C A G
C	CTT } Leu CTC CTA CTG	CCT } Pro CCC CCA CCG	CAT } His CAC CAA } Gln CAG	CGT } Arg CGC CGA CGG	T C A G
A	ATT } Ile ATC ATA ATG Met	ACT } Thr ACC ACA ACG	AAT } Asn AAC AAA } Lys AAG	AGT } Ser AGC AGA } Arg AGG	T C A G
G	GTT } Val GTC GTA GTG	GCT } Ala GCC GCA GCG	GAT } Asp GAC GAA } Glu GAG	GGT } Gly GGC GGA GGG	T C A G

شكل 1: يمثل الحموض الأمينية المشكلة للبروتينات والثلاثيات المحتملة عن ترجمة الــDNA لكل شفرة كودون واحدة.

وأنواع الطفرات هذه هي:

طفرات صامتة Silent mutations: وهي الطفرات التي ينتج عنها نفس الحمض الأميني.

wild-type	TACAACGTCACCATT	sense strand
	AUGUUGCAGUGGUAA	mRNA
	meth-phen-gln-trp	
silent mutant	TACAAgGTCACCATT	sense strand
	AUGUUcCAGUGGUAA	mRNA
	meth-phen-gln-trp	

طفرات محايدة Neutral mutations: والتي ينتج عنها حمض أميني مختلف ولكن هذا الحمض الأميني يملك نفس الخواص الكيميائية للحمض الأميني الأصلي (قبل الطفرة)

wild-type	TACAACGTCACCATT	sense strand
	AUGUUGCAGUGGUAA	mRNA
	meth-phen-gln-trp	
	TACgACGTCACCATT	sense strand
	AUGcUGCAGUGGUAA	mRNA
	meth-leu-gln-trp	

طفرات Missense mutations: والتي ينتج عنها حمض أميني مختلف.

wild-type	TACAACGTCACCATT	sense strand
	AUGUUGCAGUGGUAA	mRNA
	meth-phen-gln-trp	
missense mutant	TACAACtTCACCATT	sense strand
	AUGUUGaAGUGGUAA	mRNA
	meth-phen lys-trp	

طفرات الإيقاف Nonsense mutations: والتي ينتج عنها شيفرة توقف مما يؤدي إلى ترجمة بروتين مجتزأ (مبتور).

wild-type	TACAACGTCACCATT	sense strand
	AUGUUGCAGUGGUAA	mRNA
	meth-phen-gln-trp	
nonsense mutant	TACAACaTCACCATT	sense strand
	AUGUUGuAGUGGUAA	mRNA
	meth-phen stop	

طفرات الانزياح (الإدخال Insertions أو الحذف Deletions): وتتم من خلال إضافة أو حذف واحد أو أكثر من النكليوتيدات، إن أي تبدل في منطقة تشفير المورثة (إدخال أو حذف) سوف يسبب إزاحة shift في منطقة القراءة reading frame (frameshift)، مما ينتج عنه سلسلة حموض أمينية مختلفة، وهذه يمكن أن تبدّل بشكل معنوي المنتج المورثي (البروتين).

wild-type	TACAACGTCACCATT	sense strand
	AUGUUGCAGUGGUAA	mRNA
	meth-phen-gln-trp	
frameshift mutant	TACAACGgTCACCATT	sense strand
	AUGUUGCcAGUGGUAA	mRNA
	meth-phen pro-val-val	

2.1.2.3.2. Large-scale mutations: وهي الطفرات التي تؤثر على تؤثر على عدد كبير من النكليوتيدات، وبالتالي تؤثر على بنية الصبغي، وهي تتضمن:

- **التضاعفات المورثية gene duplications** وهي تقود إلى نسخ متعددة من المناطق الصبغية، وتزيد في جرعة التأثير أو التعبير المورثي للمورثات المتوضعة ضمن هذه المناطق.
- **الحذف Deletion** وفيها يحدث حذف مناطق كبيرة من الصبغي وهي تؤدي إلى ضياع المورثات الموجودة ضمن المناطق المحذوفة.

2.2.3.2. الطفرات التي تؤثر على وظيفة البروتين

By aspect of protein function affected

قد تؤثر الطفرة (حسب مكان حدوثها ضمن المجموع الوراثي) وتغير في تركيب وترتيب الحموض الأمينية الناتجة عن عملية الترجمة، يختلف تأثير هذه الطفرات على وظيفة البروتين، اعتماداً على ذلك يمكن تقسيمها إلى:

1.2.2.3.2. طفرات ضياع الوظيفة Loss-of-function mutations: وتكون نتيجتها هي منتج مورثي يملك أقل أو لا وظيفة. تدعى غالباً طفرة amorphic mutation.

2.2.2.3.2. طفرات كسب (ربح) الوظيفة Gain-of-function mutations: تغير في المنتج المورثي مثل تلك التي ينتج عنها وظيفة جديدة أو غير طبيعية. تملك هذه الطفرات في الغالب نمطاً ظاهرياً سائداً (مسيطراً) dominant phenotypes. وغالباً ما تدعى neomorphic mutation.

3.2.2.3.2. الطفرات السالبة السائدة Dominant negative mutations: (تدعى أيضاً بطفرات antimorphic mutations) وهي تغير (تبدل) في المنتج المورثي إلى نمط مخالف للنظير ذو النمط البري (غير الطافر). ينتج عن هذه الطفرات عادةً تبدل في الوظيفة الجزيئية molecular function (ولكن غالباً تكوّن بروتين غير فعال أو غير نشط inactive) وهي مميزة بوساطة نمط شكلي phenotype سائد (مسيطر) أو شبه سائد semi-dominant، (Ellis et al., 2001)

4.2.2.3.2. الطفرات المميتة Lethal mutation: وهي الطفرات التي تنتج عن حدوث تبدلات في التتابع النكليوتيدي ضمن المورثات الحيوية مسببة موت الفرد الحامل لها من خلال تغير الناتج البروتيني لهذا التتابع ومؤدية إلى نمط مورثي وشكلي غير قادر على الإنتاج المؤثر.

3.2.3.2. الطفرات التي تؤثر في النمط الشكلي

By aspect of phenotype affected

- الطفرات الشكلية (المورفولوجية) morphological mutations غالباً ما تؤثر على المظهر الخارجي للفرد. يمكن لهذه الطفرات على سبيل المثال أن تغير طول النبات أو أن تغير شكل البذور من ناعمة إلى خشنة.
- الطفرات الحيوية الكيميائية Biochemical mutations تظهر بشكل ضرر lesions بإيقافها المسارات الأنزيمية enzymatic pathway. وغالباً ما تكون الطفرات المورفولوجية نتيجة مباشرة للطفرات التي تحدث للمسارات الأنزيمية.

3.3.2. معدل حدوث الطفرات الطبيعية

Natural Mutation Rate

في علم الوراثة، يقصد بمعدل أو نسبة حدوث الطفرات mutation rate، فرصة حدوث أو ظهور الطفرة في المتعضية (الكائن) أو المورثة في كل نسل (خلال الانقسام الخلوي في حالة الكائنات المتعددة الخلايا). أما تكرار الطفرة فهو عدد الأفراد ضمن الجماعة الذين يملكون نفس الطفرة، (Nachman et al., 2000).

تشير الأبحاث الحديثة إلى أن الأخطاء الواقعة عند نسخ وتضاعف الــDNA (حلول أساس قاعدي مكان أساس قاعدي مكان أساس قاعدي آخر) تحدث بنسبة 1×10^{-11}، فمورث يحتوي على حوالي 1000 زوج نكليوتيدي (أساس قاعدي) يتعرض بالمتوسط أثناء التضاعف أو النسخ إلى خطأ مرة واحدة كل 100 مليون تكرار أو تضاعف. من جهة أخرى،

يبدو أن معدل حدوث الطفرات يختلف من مورث إلى آخر (Nachman et al., 2000 وRussell et al., 2000).

بصورة عامة، فإن معدل الطفرات الطبيعية عند حقيقيات النوى يتراوح من $1 X 10^{-4}$ إلى $1 X 10^{-6}$ لكل زوج أو شفع قاعدي لكل جيل (Russell et al., 2000)، في حين يكـــون هذا المعدل عند البكتريا حوالي $1 X 10^{-8}$ لكل زوج قاعـــدي لكل جيل (Drake et al., 1998). أما أعلى معدل طفرات فيوجد عند الفيروسات (التي تملك مجموع وراثي من الـــDNA أو الـــRNA، إذ يصل معدل الطفرات عند تلك التي يكون مجموعها الوراثي مؤلفاً من DNA من $1 X 10^{-6}$ وحتى $1 X 10^{-8}$ لكل زوج قاعدي لكل جيل، في حين يكون معدل الطفرات عند تلك التي يكون مجموعها الوراثي مؤلفاً من RNA من $1 X 10^{-3}$ وحتى $1 X 10^{-5}$ لكل زوج قاعدي لكل جيل، (Drake and Holland, 1999). إن معدل الطفرات المرتفع عند الفيروسات يمكن أن يكون ميزة للفيروسات، حيث أن هذه الفيروسات تتطـــور باستمرار وبسرعة، فهي على سبيل المثال تتجنب ردود الفعل الدفاعية لدى جهاز المناعة البشـــري، (Holland et al., 1982). يملك الـــRNA معـــدل أو نسبة حدوث طفرات أكبـــر من الـــDNA، وذلك بسبب أن عـــدة آليات تصليح للـــDNA يمكن أن تصحح الأخطاء أو الطفرات قبل أن تصبح ثابتة في المجموع الوراثي كطفرات (Nachman et al., 2000).

يختلف معدل الطفرات أيضاً حسب الأجناس، وقد وضع علماء التطور نظريات بأن المعدل الأعلى للطفرات هو مفيد في بعض الحالات، لأنها تسمح للمتعضيات بأن تتطور ولذلك تتكيف بسرعة أكبر مع المحيط البيئي. يزداد معدل حدوث الطفرات بشكل كبير بوساطة الأشعة، كأشعة X وأشعة غاما والنيترون وبعض المواد الكيميائية أو بوساطة المعاملة بالمواد المسرطنة carcinogens وغيرها. كما يقصد بالمطفرات العوامل التي تزيد من معدل حدوث الطفرات ضمن المتعضية (Allaby, 1998).

4.2. الأضرار الحاصلة للـDNA وآلية إصلاحها

DNA Damage and Repair

تحصل أضرار الـDNA نتيجة التأثر بالعوامل البيئية المحيطة وعمليات الاستقلاب الطبيعية داخل الخلية، ويكون معدل حدوث الخطأ أو الضرر من 1000 وحتى 1000000 ضرر جزيئي molecular lesions في كل خلية. ولكن يظل هذا الرقم صغيراً مقارنةً مع حجم المجموع الوراثي للكائن، فعلى سبيل المثال لا يشكل هذا الرقم سوى 0.000165% من حجم المجموع الوراثي لدى الإنسان (ما يقرب من 6 مليارات قاعدة أساسية أو 3 مليارات زوج أو شفع قاعدي). لكن ليس كل الأضرار الحاصلة يتم إصلاحها وبالتالي يمكن أن تنعكس هذه الأضرار على شكل تغير أو تبدل في التعبير الوراثي للمورثات التي تحدث فيها هذه الأضرار أو الأخطاء (Lodish et al., 2004).

تختلف مصادر أو مسببات الضرر ولكن يمكن تقسيمها إلى نوعين رئيسيين، الأول وهو الأضرار الداخلية كتلك الناتجة عن مهاجمة أنواع الأكسجين التفاعلية reactive oxygen species الناتجة عن مشتقات الاستقلاب (طفرات تلقائية). أما النوع الثاني فهو يتضمن العوامل الخارجية وهي كثيرة كما ذكر سابقاً (مثل الأشعة والمواد الكيميائية وغيرها)، (Roulston et al., 1999)

إن الأضـــرار الداخلية الناتجـــة عن العمليات الخلوية الذاتيـــة عديدة، تتمثل في أكسدة القواعد الأساسية oxidations of bases والألكلة alkylation of bases (عادةً المثيلة DNA methylation) والتحلل hydrolysis of bases وعدم تطابق القواعد mismatch of bases، نتيجة الأخطاء الحاصلة أثناء عملية تضاعف الحمض النووي، كذلك تسبب العوامل الخارجية أضراراً عديدة تم ذكرها سابقاً. من المهم التمييز بين الضرر وطفرات الـDNA، فأضـــرار الـDNA هي عبارة عن تشوهات فيزيائيـــة في بنية وتركيب الـDNA مثل التقطعات في الأشـــرطة المفردة والمضاعفة للـDNA. على النقيـــض من ذلك، فإن الطفـــرات هي عبارة عـــن تغيـــرات في تسلسل الـDNA (changes in DNA sequencing). لا يمكن لأنزيمات الإصلاح أن تميّز الطفرات عندما

يكون التبدل في كلا شريطي الـــDNA ولذلك في هذه الحالة لا يمكن لهذه الطفرات أن يتم إصلاحها. على الرغم من الاختلاف بين أضرار الـــDNA والطفرات، إلا أن الأضرار والطفرات هي مترافقة أو ذات صلة لأن أضرار الـــDNA غالباً ما تسبب أخطاء في تركيب (تصنيع) الـــDNA أثناء عملية التضاعف وهذه الأخطاء هي المصدر الرئيسي للطفرات.

نظراً لهذه الخصائص لأضرار وطفرات الـــDNA، يمكن أن نرى أن أضرار الـــDNA يمكن أن تساهم في تشكيل حالة عدم انقسام أو بطء في انقسام الخلايا، إذ أنه دون إصلاح للأخطاء هذه سوف تتراكم مع مرور الوقت مسببة مشاكل في انقسام الخلية. من ناحية أخرى، وفي الخلايا المنقسمة بسرعة، فإن أخطاء الـــDNA التي لا يتم إصلاحها والتي لا تسبب موت الخلية سوف تميل إلى أن تسبب تكراراً لهذه الأخطاء، وبالتالي حدوث الطفرة التي تنتقل إلى الأجيال اللاحقة.

تختلف إستراتيجية الإصلاح لاستعادة المعلومات المفقودة اعتماداً على نوع الضرر الذي يلحق بالبنية الحلزونية لشريط الـــDNA، فعند الإمكان تستخدم الخلايا شريط الـــDNA المتمم وغير المعدل أو الشريط المقابل في الكروماتيد الأخوي (الصبيغي) كقالب لاستعادة المعلومات الأصلية. تتم بعض عمليات الإصلاح بدون الاستعانة بالقالب، وفيها يمكن للخلايا أن تستخدم آلية استرداد التوليف error-prone recovery كملاذ أخير.

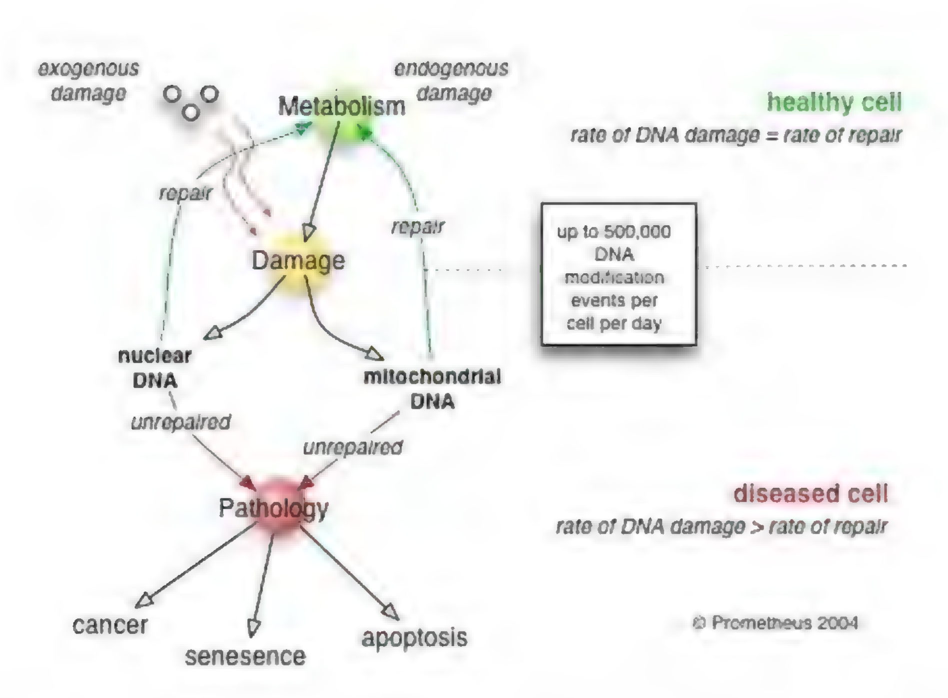
إن الأضرار التي تلحق بالـــDNA تغّير من التكوين الشكلي أو البنيوي للحلزون ومثل هذه التغيرات يمكن أن يتم التقاطها من قبل الخلية، حالما يتم تحديد مكان الضرر أو الخطأ، تتحد جزيئات إصلاح الـــDNA محددة ونوعية specific DNA repair molecules عند أو قرب موقع الضرر متضمنةً ارتباط جزيئات أخرى والتي تشكل معقد يمكّن عملية الإصلاح الفعلي لتأخذ مكانها. إن نمط الجزيئات المتضمنة وآلية التصليح التي يتم استخدامها تعتمد على نوع الضرر الذي يحدث وعلى الحالة (الطور) من الانقسام الخلوي (دورة حياة الخلية) الذي توجد فيه الخلية.

من المعروف أن الخلايا تستبعد ثلاثة أنواع من الأضرار للـــDNA بوساطة عكسها كيميائياً، حيث لا تتطلب هذه الآليات لقالب template طالما أن نمط الضرر الذي يحدث

يمكن مواجهته في حالة ظهور واحد من أصل أربعة قواعد أساسية موجودة. وتكون مثل هذه الآليات العكسية، نوعية ومحددة لنوع الضرر الحاصل ولا تكون متضمنة كسرات في العمود الفقري لزمرة الفوسفات. عندما يحدث الخطأ لأحد شريطي الـــDNA فقط فإن آلية الإصلاح تعتمد على استخدام الشريط الثاني كقالب للاسترشاد به في تصحيح الخطأ، ومن أجل إصلاح الأضرار التي لحقت بواحد من اثنتين من جزيئات الحمض النووي المقترنة، يوجد عدد من آليات الإصلاح التي تقوم بإزالة الضرر النكليوتيدي وتستبدله بنكليوتيد آخر متمم من الشريط غير المتضرر (Watson et al., 2004). إن الخلايا المعرضة للإشعاعات المؤينة والأشعة فوق البنفسجية أو المواد الكيميائية تكون عرضة لأن يحدث في الـــDNA الخاص بها مواقع تطفير متعددة، وهذه المواقع أو الطفرات يمكن أن تسبب أضرار مختلفة للـــDNA كالتقطعات التي تحصل في الشريط الثنائي، الأكثر من ذلك فإن العوامل التي تسبب الضرر للـــDNA يمكن أن تلحق الضرر بالجزيئات الحيوية الأخرى مثل البروتينات والسكريات والليبيدات والـــRNA.

بعد حصول الضرر في الـــDNA يتم تفعيل ما يمكن تسميته نقاط فحص دورة حياة الخلية cell cycle checkpoints، يقوم نظام الفحص أو التحقق هذا بإيقاف أو تجميد pause دورة انقسام الخلية بشكل مؤقت معطياً الوقت الكافي للخلية للقيام بعملية إصلاح الضرر قبل متابعة الانقسام الخلوي، تظهر نقاط الفحص خلال أطوار الدارة الخلوية المختلفة G1 وS وG2 وM. هذا ويتم التحكم بتفعيل نقاط الفحص من خلال اثنتين من أنزيمات الكيناز kinases الرئيسية وهما *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*) و*ATR* (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*)، (Schönthal, 2004).

أحياناً يكون معدل الأخطاء التي تحدث ضمن الحمض النووي كبيراً ويفوق الطاقة الاستيعابية لعمليات الإصلاح ضمن الخلية، وبالتالي تنتقل هذه الأخطاء إلى الأجيال اللاحقة مسببة الطفرة. عندما تتراكم الأخطاء دون عمليات إصلاح أو تصحيح يمكن أن تطغى على الخلية مؤدية إلى الشيخوخة المبكرة، أو الخلايا السرطانية (Kobayashi et al., 2004) (شكل 2)

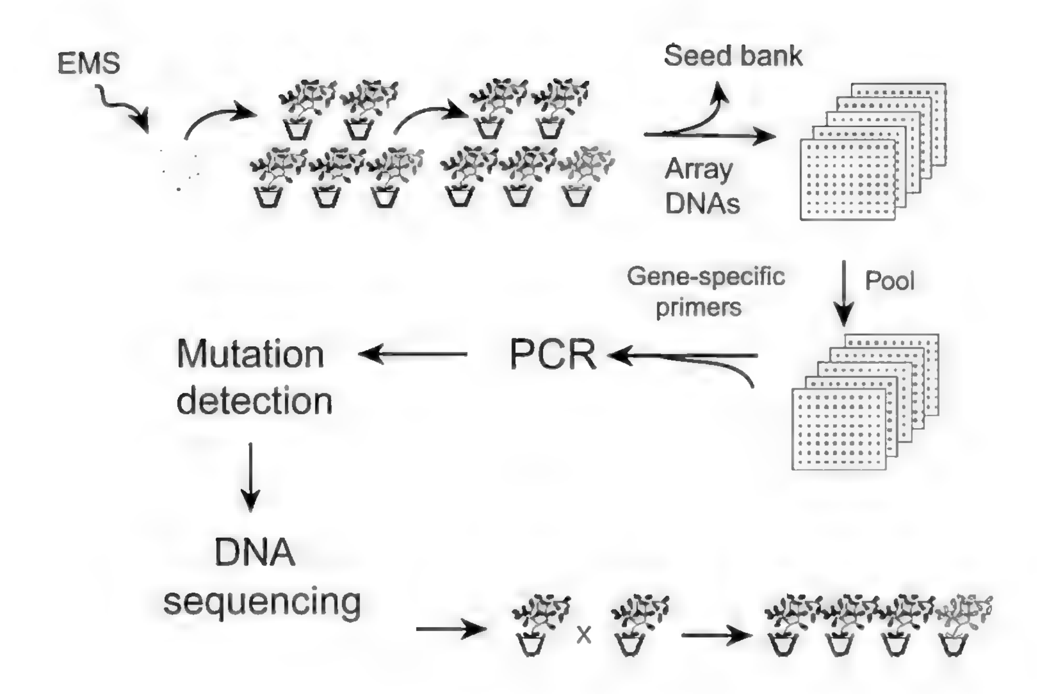


شكل 2: يبين معدل الأخطاء الداخلية والخارجية وأهميتها كمحدد لصحة ومرض الخلية. في الخلية السليمة، يكون معدل الأخطاء مساوياً لمعدل الإصلاح، في حين يكون معدل الأخطاء أعلى من معدل الإصلاح في الخلايا المريضة.

5.2. التطفير في تقانة الـــTILLING

TILLING Mutagenesis

تعتبر خطوات تقانة الـــTILLING واحدة عند جميع النباتات المراد تطبيق هذه التقانة عليها، وهي موضحة بالشكل 3، (Henikoff and Comai, 2003).



شكل 3: يمثل المراحل الأساسية المستخدمة في تقانة الـ TILLING عند نبات الـ *Arabidopsis*.

تبدأ هذه التقانة بمرحلة التطفير بالمواد الكيميائية (استخدام أزيد الصوديوم أو الـ EMS)، تليها مرحلة زراعة البذور والوصول إلى الجيل الثاني، ثم عزل عينات الـ DNA ومزجها، تتم بعدها غربلة عينات الجماعة للبحث عن الطفرات في المورثة أو المورثات الهدف بوساطة تفاعل الـ PCR، بعد تحديد الطفرات يتم تحديد التتابع النكليوتيدي لعينات الـ DNA الحاوية على الطفرات والمكتشفة ضمن المورثة أو المورثات الهدف لمعرفة نوع الطفرة المكتسبة وبالتالي طبيعة تأثيرها على الحموض الأمينية أو البروتين، تليها مرحلة فحص التغير أو التغيرات المظهرية أو الشكلية الناتجة عن حدوث الطفرات في الأفراد المكتشف فيها هذه الطفرات (Henikoff and Comai, 2003).

1.5.2. مرحلة التطفير

Mutagenesis

تسبب مطفـرات كيميائيــة معينــة مثل ايثيـل ميثــان سلفنــات (EMS) ethylmethanesulfonate وأزيد الصوديوم (Sodium Azide) تطفير نقطي point mutations عشوائي على مستوى المجموع الوراثي ككل للكائن أو النبات المطفر، وهو ما يعني حدوث تبدلات نكليوتيدية مفردة على طول شريط الــDNA المكوّن للمجموع الوراثي (Koornneef *et al.*, 1982 و Ashburner, 1999)، وقد استخدم هذا النوع من المطفرات لعقود عدة في الدراسات الوراثية الأمامية (المباشرة) forward-genetic وذلك لإنتاج سلسلة نظائر من الطفرات التي قد تؤدي بالنتيجة إلى تغيرات بروتينية ووظيفية حسب طبيعة التبديل النقطي في المورثة الهدف، وتجدر الإشارة إلى أنه تم استخدام هذا النوع من المطفرات عند كل من النبات والحيوان، وبسبب ذلك اعتمد الباحثون على هذا النوع من المطفرات في تطوير الدراسات الوراثية العكسية، وقد اعتبر هذا النوع من المطفرات الكيميائية ذو أهمية كبيرة، إذ تم استخدامها في تطوير تقانة الــTILLING هدف الدراسة في هذا البحث، وهي تقانة استهداف الأضرار الموضعية المحدثة ضمن المجاميع الوراثية Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) (McCallum *et al.*, 2000)، ففي هذه الإستراتيجية أو التقانة، يتبع عملية التطفير مرحلة غربلة الطفرات النقطية المحدثة ضمن المورث الهدف وذلك ضمن مزيج من عينات الــDNA (DNAs pool).

ينتج عن استخدام المطفرات الكيميائية المذكورة في تقانة الــTILLING سلسلة من الطفرات النقطية الممتدة على طول المجموع الوراثي، يليها مرحلة الكشف عن الطفرات Knock-out mutations ضمن الأفراد التي تحتوي على هذه الطفرات النقطية ضمن المورثة أو المورثات الهدف، إن الكثافة العالية (high density) من الطفرات النقطية المحدثة في هذه التقانة تجعلها مناسبة من أجل المورثات الهدف الصغيرة نسبياً. كما يمكن تطبيقها أيضاً حتى وإن كانت المعلومات المتوفرة عن التتابع النيكليوتيدي للمجموع الوراثي محدودة بالنسبة للمورثات الهدف. بعكس تقانة التطفير المدخل insertional mutagenesis،

فإن تقانة الـــTILLING يمكن تطبيقها بشكل عام على العديد من الكائنات الحية، وهي مرشحة لأن تصبح التقانة المعيارية الأولى في استراتيجيات التطفير الكيميائي المستخدمة في دراسات الوراثة العكسية ومعرفة وظيفة المورثات، (شكل 3)

2.5.2. المواد الكيميائية المطفرة المستخدمة في تقانة الـــTILLING

Chemical mutagens used in TILLING Technique

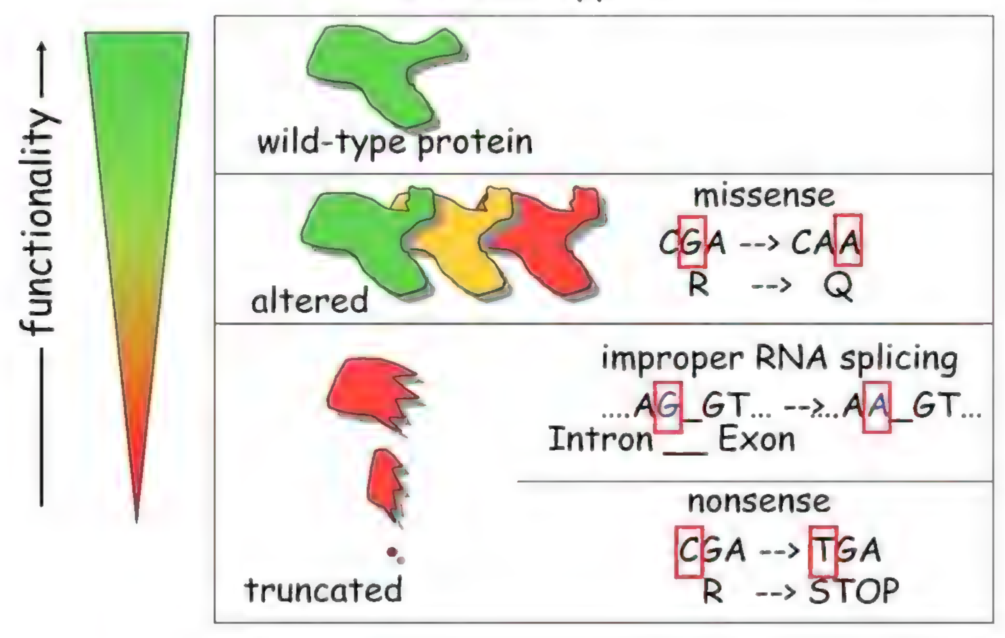
هناك مادتين كيميائيتين تسخدمان في هذا المجال (التطفير من أجل تقانة الـــTILLING)، تملك هاتين المادتين خواص مشتركة فيما يخص إحداث الطفرات النقطية العشوائية، وهما مادة ايثيل ميثان سلفنات EMS ومادة أزيـــد الصوديوم NaN3.

1.2.5.2. ايثيل ميثان سلفنات Ethyl Methane Sulfonate

تعتبر مادة ايتيل ميثان سلفنات من المواد المطفرة mutagenic والمسببة لتشوهات خلقية teratogenic، ومن الممكن أن تكون مسرطنة carcinogenic organism compound، وهي ذات صيغة كيميائية $C_3H_8O_3S$. ينتج عن المعاملة بهذه المادة طفرات عشوائية في المادة الوراثية عن طريق إحداث تبدلات نكليوتيدية nucleotide substitution في (المجموع الوراثي)، وخاصة guanine alkylation إذا ما إستخدمت بتراكيز معينة، وهذا يؤدي إلى حدوث طفرات نقطية point mutation. تحدث هـــذه المادة طفرات بمعدل 5×10^{-4} إلى 5×10^{-2} لكل مورثة من دون إحداث ضرر أو أذى كبير substantial killing قد يؤدي إلى موت الخلية. إن مجموعة (زمرة) الايتيل في مركب الـــEMS تتفاعل مع الغوانين في الـــDNA، مشكلةً قاعدة غير طبيعية (شاذة) (O-6-ethylguanine). خلال تضاعف الحمض النووي منقوص الأكسجين DNA replication يقوم أنزيم التضاعف أو النسخ DNA polymerase بتحفيز عملية ارتباط التيامين thymine عوضاً عن السيتوزين cytosine بتكرار كبير وبشكل مقابل لـــO-6-ethylguanine. وفي دورات تضاعف الـــDNA اللاحقة تكون النتيجة هي استبدال الزوج القاعدي الأصلي G:C ليصبح T:A، وهذا بالطبع يؤدي إلى تغير في المعلومات الوراثية اعتماداً على نوع الحمض الأميني الناتج

عن عملية التغيير الحاصلة في الزوج القاعدي (الشفع النكليوتيدي)، قد تكون هذه التغيرات مفيدة أو ضارة على الخلية أو الكائن تبعاً لطبيعة التغير الحاصل في المورثة والبروتين الناتج عن الترجمة فقد تؤدي إلى ضياع وظيفة المورثة وخاصة عندما ينتج عن التبديل النكليوتيدي طفرة Nonsense mutation، حيث ينتج عنها بروتين منقوص أو مجتزأ مما يؤدي إلى ضياع الدور الذي كان يقوم به، (شكل 4). تستخدم هذه المادة غالباً في الأبحاث الوراثية كمادة مطفرة لأغراض وأهداف دراسية (بحثية) وراثية أو في فحوص أخرى.

استخدمـــت هذه المادة لعقـــود في دراسات الغربلة الوراثية الأمامية أو المباشرة وفـــي دراسات التنوع الحيوي، فقد تم إثبات جدوى استخدامها في دراسات التطفير عند كل من النبات والحيوان، وخاصة لدى الكائنات المستخدمة كنموذج مثل ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster* والـــ*Arabidopsis thaliana*. تعتبر مادة الـــEMS ثابتة، ويمكن استخدمها بتراكيز مختلفة، تؤدي المعاملة بهذه المادة إلى الحصول على صفات جديدة قد تكون مميتة وبالتالي تؤدي إلى ظهور أفراد في النسل الناتج غير قادرة على الحياة، ومن خلال الدراسات تبين أن نسبة الأفراد غير القادرة على الحياة تتناسب بشكل طردي مع تركيز مادة الـــEMS المطفرة فهي تكون أعلى في التراكيز العالية منها في حين أن العكس صحيح أيضاً، (Koornneef et al., 1982،Ashburner, 1990). كان معدل الطفرات النقطية (الاستبدالات النكليوتيدية) متشابهة عند معاملة كل من بذور الـــ*Arabidopsis* (McCallum *et al*., 2000) وذكور ذبابة الفاكهة (Bentley *et al*., 2000)، بالإضافة إلى أنها كانت متقاربة مع النسبة المكتشفة لدى معاملة نسل السمك المخطط Zebrafish بالمادة المطفرة ENU.



شكل 4: يظهر الشكل تأثير نوع الطفرة النقطية على المورثة أو المنتج المورثي وبالنتيجة على وظيفة البروتين، وذلك حسب نوع الطفرة النقطية المحدثة.
(www.uark.edu/ua/ricecap/pdfs/houston/genomics/Comai.pdf)

2.2.5.2. أزيد الصوديوم Sodium azide (NaN3)

مادة كيميائية عديمة الرائحة شديدة السمية توجد بشكل صلب أبيض، تنحل في الماء ببطء مطلقةً غاز أزيد الهيدروجين hydrogen azide (NH_3) شديد السمية، والذي يتشكل أيضاً عندما يتفاعل NaN_3 مع حمض قوي. كما أنه يمكن أن يتفاعل مع شوارد المعادن الثقيلة مثل النحاس والفضة والرصاص ليشكل أزيد المعدن، وهذا يكون بشكل غير ثابت (مستقر) يمكن أن ينفجر بسهولة.

الطريقة الشائعة في تحضير هذا المركب وحسب مقياس Wislicenus، هي حسب التفاعل المبين أدناه، وفيها يتفاعل أولاً معدن الصوديوم Na مع الأمونيا NH_3 ليعطي أميد الصوديوم كما في المعادلة التالية:

$$2Na + 2NH_3 \rightarrow 2NaNH_2 + H_2$$

بعدها يتفاعل الصوديوم مع أكسيد النتروز nitrous oxide وفق:

$$2NaNH_2 + N_2O \rightarrow NaN_3 + NaOH + NH_3$$

تعتبر هذه المادة من المطفرات الكيميائية المستخدمة لتطفر النباتات وهي أحد المسببات للطفــرات في الكائنات الحية، فمن المعــروف أن للعديد من المواد الكيميائية تأثيرات سلبيــة على الكائن الحي. فالعــديد من هذه المــواد له تأثيــر ضار علــى الصبغيات (chromosome-damaging) فهــي تؤثر على النباتات عن طريق تفاعل oxygen-derived radicals (Yuan and Zhang, 1993)، يمكن أن تظهر هذه التأثيرات بطريقة تلقائية بعد إحداث الطفرات. يعتبر استخدام أزيد الصوديوم شائع الاستخدام في المختبرات الكيميائية ويستعمل على نطاق واسع في مجالات الصناعة والزراعة والخدمات الطبية وفي أبحاث الصناعات العضوية، وكان قد استخدم كمولد لغاز النتروجين المستخدم في الأكياس الهوائية التي تقي من الحوادث في السيارات (Kleinhofs et al., 1978)، ويستخدم كحافظ كيميائي في المشافي والمخابر، كما يستخدم أزيد الصوديوم في أجهزة التفجير. وقد بينت الدراسات أنه يؤثر على فيزيولوجية النبات وينقص من مقاومة خلايا بعض النباتات للسيانيد cyanide-resistant respiration فقد تم كشف ذلك في خلايا نبات التبغ غير المتمايزة tobacco callus (Wen and Liang, 1995)، كما تم إثبات القدرة الكامنة التطفيرية لأزيد الصوديوم في عدة أبحاث. يستخدم أزيد الصوديوم كمبيد جرثومي bactericide، ومبيد حشري pesticide، ومولداً لغاز الآزوت (النتروجين) في الاستعمالات الصناعية.

تستخدم مادة أزيد الصوديوم كمطفر وراثي mutagenic قوي للعديد من المتعضيات الحية متضمناً النبات والحيوان (Veleminsky and Anglis, 1987 وRines, 1985

Raicu and و Grant and Salamone, 1994و Owais and Kleinhofs, 1988و Mixich, 1992و González-César and Ramos-Morales, 1997). كما استخدم أزيد الصوديوم منذ عقود في تطفير عدد من الكائنات الحية مثل ذبابة الفاكهة *Drosophila* (Kamra and Gallopudi, 1979) والـ*Arabidopsis* (Gichner and Veleminsky, 1977). وكانت دراسات سابقة قد أظهرت بوضوح بأن القدرة التطفيرية لأزيد الصوديوم هي متوسطة من خلال الإنتاج العضوي للأزيد (Owais and Kleinhofs, 1988).

استخدم أزيد الصوديوم كوسيط agent من أجل دراسة إصلاح الأضرار الوراثية الناجمة عن الإشعاع المحدث radiation-induced وكمطفر في السويقات الجنينية لبذور الشعير (Pearson et al., 1975). كما يعتبر أزيد الصوديوم مطفر فعّال وقوي في الشعير (بشكل خاص في إحداث طفرات نقص اليخضور chlorophyll deficiency)، كما أنه يولد طفرات شكلية morphological وفيزيولوجية physiological وخلوية cytogenetic. كما يعتبر أزيد الصوديوم مركب ذو كفاءة تطفيرية عالية حتى على مستوى الصبغيات، إذ ثبت أنه يحدث طفرات صبغية (إعادة ترتيب صبغي chromosome aberration) عنـــد العديد من النباتات، منها الشعير وفول الصويا soybean والفول vicia (Sideris et al. 1973 و Kanaya et al. 1994و Veleminsky *et al.* 1987و Grant and Salamone 1994). إن استخدام هذه المادة بتراكيز معينة يعطي تأثيراً تطفيرياً مشابهاً لمادة EMS من حيث توليد طفرات نقطية عشوائية موزعة على امتداد المجموع الوراثي للنبات المطفر.

3.5.2. معدل الطفرات النقطية الناتجة عن المعاملة بالمطفرات الكيميائية

Mutation rate of treated organisms by chemical mutagenesis

بينت الدراسات بأنه لا توجد علاقة بين حجم المجموع الوراثي ونسبة الطفرات النقطية الناتجة عن المعاملة بمادة مطفرة مثل الـــEMS فقد كان تكرار الطفرات المحدثة في دراسات أجريت على عدد من المورثات عند كل من الـــ*Arabidopsis* والذرة متشابهة (Goll and Bestor, 2002)، مع العلم أن حجم المجموع الوراثي للذرة أكبر بعشرين مرة تقريباً من المجموع الوراثي للـــ*Arabidopsis*. مما أعطى فرصة كبيرة لاستخدام الـــEMS

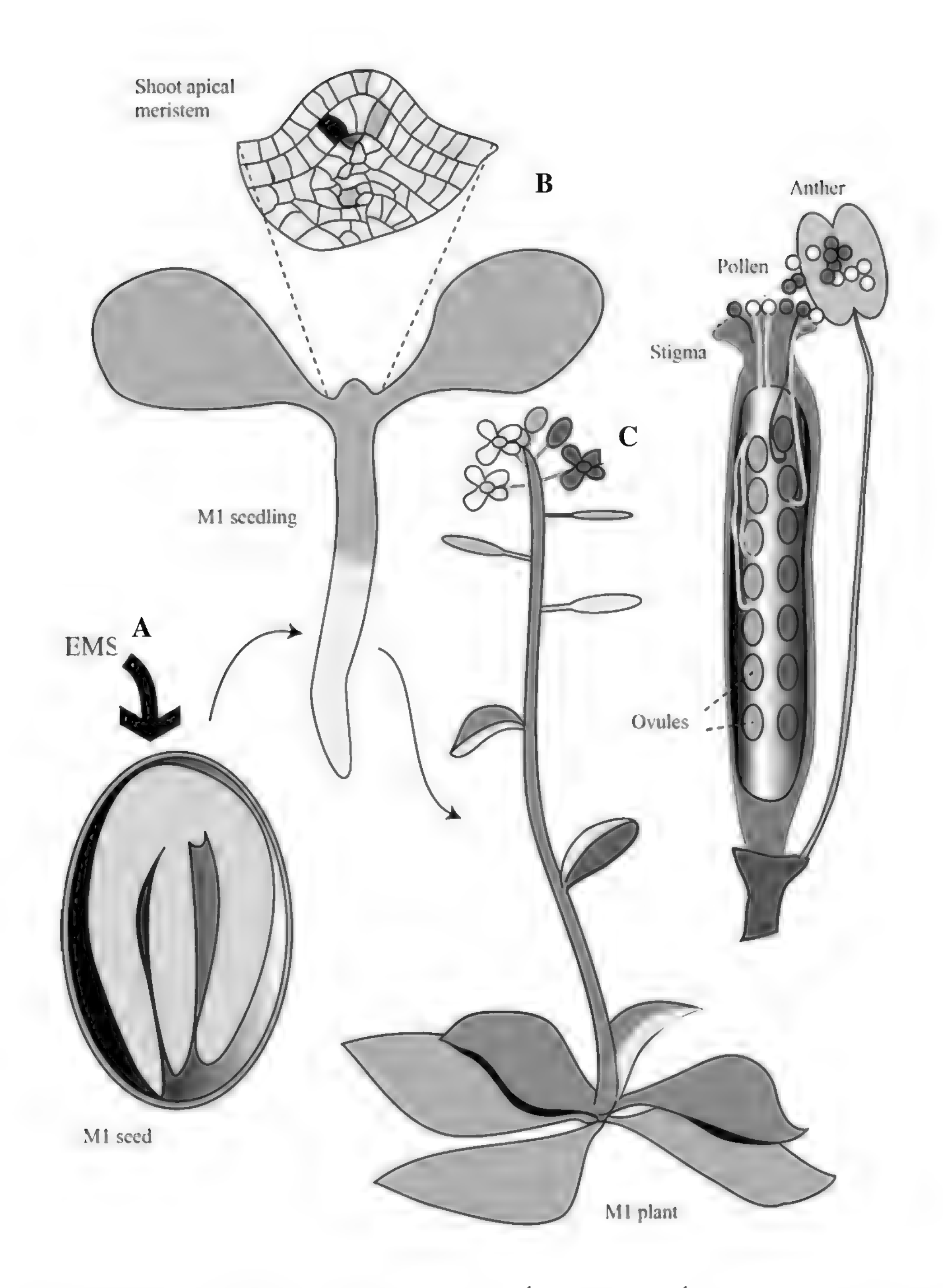
بشكل واسع عند العديد من الكائنات، وعلى أية حال فإن تأثير المادة المطفرة كمادة EMS أو أزيد الصوديوم يمكن أن يختلف اعتماداً على الأنواع المطفرة، كما يمكن أن تتغير نسبة التطفير اعتماداً على نوع المطفر نفسه (Zhu et al., 1995)، لذلك تعتبر جرعة التطفير اللازمة والفاعلة من أجل إحداث الطفرات النقطية واحدة من أكبر التحديات التي تواجه الباحثين خلال العمل على تقانة الـــTILLING. إذ أن المعاملة بجرعات كبيرة يمكن أن تؤدي إلى موت (عدم إنبات، عدم نمو)، أو عقم معظم النسل المعامل، في حين ينتج عن المعاملة بجرعات صغيرة كثافة متدنية من الطفرات وبالتالي سيتطلب ذلك العمل على جماعات أكبر وإجراء المزيد من عمليات الغربلة للحصول على سلسلة نظائر (Alleles) طفرات ملائم. إن التغير أو التنوع في معدل الطفرات يعود إلى ميزة البذور المطفرة، حتى أن المعاملات المتشابهة لمجموعات البذور تحت نفس الظروف، بين أنواع مختلفة قد تتطلب جرعات مختلفة للمقارنة (McCallum et al., 2000 و Meissner et al., 1997)، لذلك يتطلب التطفير الكثير من التجارب قبل الوصول إلى التركيز أو الجرعة اللازمة لكل نوع من البذور، وغالباً ما يتم استخدام تراكيز أو جرعات متدرجة من المادة المطفرة ثم إجراء عملية اختيار الجرعة التي تعطي أعلى تركيز ممكن من كثافة الطفرات مع أقل نسبة ممكنة من الأفراد الميتة أو العقيمة.

لتحديد معدل الطفرات تستخدم تقانة الـــTILLING، ولكنها تتطلب حمل النبات إلى مرحلة الجيل الثاني M_2 قبل تقرير أي جرعة (تركيز) من المادة المطفرة هي الأفضل. لا توجد طرق دقيقة عامة لتقدير معدل الطفرات في نباتات (أفراد) الجيل المطفر الأول M_1، ولكن على العموم تستخدم بعض المؤشرات كدليل على نجاح عملية التطفير، ففي الـــ*Arabidopsis* تجرى عملية إحصاء الطفرات المميتة الجنينية الـــhomozygous في الجيل الأول ثم حساب النسب الماندلية من البذور غير المتطورة إلى المتطورة (نسبة البذور التي تكمل حياتها إلى التي لم تستطع إكمال حياتها) (Redei and Koncz, 1992) لمعرفة نسبة الضرر المحدث.

4.5.2. أثر التطفير في تقانة الــTILLING على الجيل الأول المطفر M_1

M_1 Generation of TILLING Mutagenesis

كما ذكر سابقاً، تبدأ خطوات هذه التقانة (عند النبات) بعملية تطفير البذور وذلك من خلال معاملتها بمادة كيميائية مطفرة معيارية مثل EMS (أو مادة Sodium Azide وهي ذات تأثير تطفيري مشابه لمادة EMS)، وعادةً ما يتم تطفير البذور عن طريق معاملتها بمحلول EMS أو أزيد الصوديوم وبتراكيز مختلفة (20 - 100 ميلي مولار) ولمدة 10 إلى 20 ساعة، تغسل بعدها البذور بالماء وتزرع مباشرةً. تشكل النباتات الناتجة عن زراعة هذه البذور ما يسمى بالجيل الطافر الأول M_1. تؤثر المادة الكيميائية المطفرة بشكل مختلف على كل خلية من خلايا الجنين داخل البذرة، وبالتالي تكون كل خلية من خلايا الجنين مطفرة بشكل مستقل (مختلف) عن الخلايا الجنينية الأخرى أي حاوية على مواقع تطفير مختلفة على طول شريطي الــDNA. كنتيجة لاختلاف خلايا الجنين بمواقع الطفرات يكون النبات الناتج عن تطوره ذو قطاعات نسيجية حاوية على طفرات مختلفة (غير متماثلة)، أي أن أفراد M_1 تشكل ما يمكن تسميته بالنسج الفسيفسائية أو الموزاييكية chimeric أي أنها تملك قطاعات نسيج مطفر، كل واحد من هذه القطاعات منحدر من خلية جنينية واحدة (شكل 5)، (Henikoff and Comai., 2003). يوجد في الــ*Arabidopsis* حوالي 2 -4 خلايا جنينية قمية (ميريستيمية) تشكل نسج الزهرة (Redei and Koncz, 1992)، إن الطفرات الموجودة أو المحدثة في هذه الخلايا والتي تكون خلايا إعادة الإنتاج reproductive تورث إلى الجيل التالي (الجيل الطافر الثاني M_2)، مع العلم أن نباتات M_1 هي ذاتية التلقيح self-fertilized في نبات الــ*Arabidopsis*.



شكل 5: يوضح الشكل تأثير المعاملة بأحد المواد الكيميائية المطفرة والتي تسبب طفرات نقطية مثل مادتي EMS وsodium azide. (A) عادةً ما تعامل البـــذور بالمادة المطفرة، وتزرع بعدها لتنتش، تنتج عن المعاملة بالمادة المطفرة طفرات مختلفة، وكل واحدة منها

تكون متخالفة اللواقح heterozygous، وتوجد في خلايا مريستيمية قمية متنوعة shoot apical meristem cells، (B). ينتج عنها في نباتات الجيل الأول الطافر قطاعات مختلفة ضمن النبات والتي البعض منها سوف يكوّن لاحقاً خلايا أم للأعضاء المنتجة (التكاثرية) reproductive organs. (C) مقطع طولي في المبيض carpels يوضح تأثير التطفير عليها في وقت التخصيب، من أجل مورثة مطفرة مفترضة hypothetical mutated gene، إذ يمثل إمكانية تشكيل نسل من الجيل الطافر الثاني M_2 متخالف ومتماثل اللواقح heterozygous وhomozygous (اليمين). على سبيل المثال حبات الطلع الفاتحة (البيضاء) (-) يمكن أن تخصّب إما كيس بيضي egg sacs (-) في مبيض فاتح أو كيس بيضي (+) في مبيض داكن. البيضات المخصبة zygotes للجيل الطافر الثاني M_2 سوف تملك نمط وراثي واحد uniform genotypes (واحد من -/- أو +/- أو +/+) في جميع خلاياها.

5.5.2. مرحلة استخلاص الــDNA ومزجها

DNA isolation and Pooling

تحصد بذور الجيل الطافر الأول وتتم زراعتها للحصول على مجموع خضري مــن أجل استخلاص المادة الوراثية DNA، والتي تستخدم من أجل غربلة الطفرات ضمن الجماعة المطفرة، بينما تخزن البذور الناتجة عن هذا الجيل (M_2) للإستفادة منها فيما بعد في دراسة التغيرات الشكلية أو الوظيفية phenotype analysis للنباتات التي تحتوي مورثاتها الهدف على طفرات نقطية (شكل 3). تمزج عينات الــDNA في مجموعات pools وهذه الــpools يتم توزيعها ضمن أطباق microtiter وتجهّز لعملية تضخيم المورثة الهدف (gene-specific PCR) باستخدام جهاز الــ PCR وتحديد مناطق تشكل العرى أو ما يمكن تسميته مناطق عدم التطابق (نكليوتيدات عدم المطابقة mismatch) في مزيج الــDNA (DNA pools)، (شكل 6).

6.5.2. تحليل الازدواج غير المتجانس

Heteroduplex analysis

يقصد بتحليل الازدواج غير المتجانس Heteroduplex analysis هنا بكشف الطفرات النقطية الناتجة عن استخدام المطفرات الكيميائية في تقانة الـTILLING عند أفراد الجماعة المطفرة وضمن التتابع النكليوتيدي للمورثة أو المورثات الهدف المدروسة من خلال تشكيل ازدواج غير متجانس بين شريطي الـDNA التابعين للمورثة الهدف المضاعفة بوساطة تفاعل الـPCR. يتم تشكيل هذا الازدواج غير المتجانس في حال وجود طفرة نقطية عند أحد عينات الـDNA ضمن المورثة المدروسة وضمن مزيج عدد من عينات الـDNA (DNA pool).

1.6.5.2. كشف الطفرات النقطية ضمن مجمع DNA

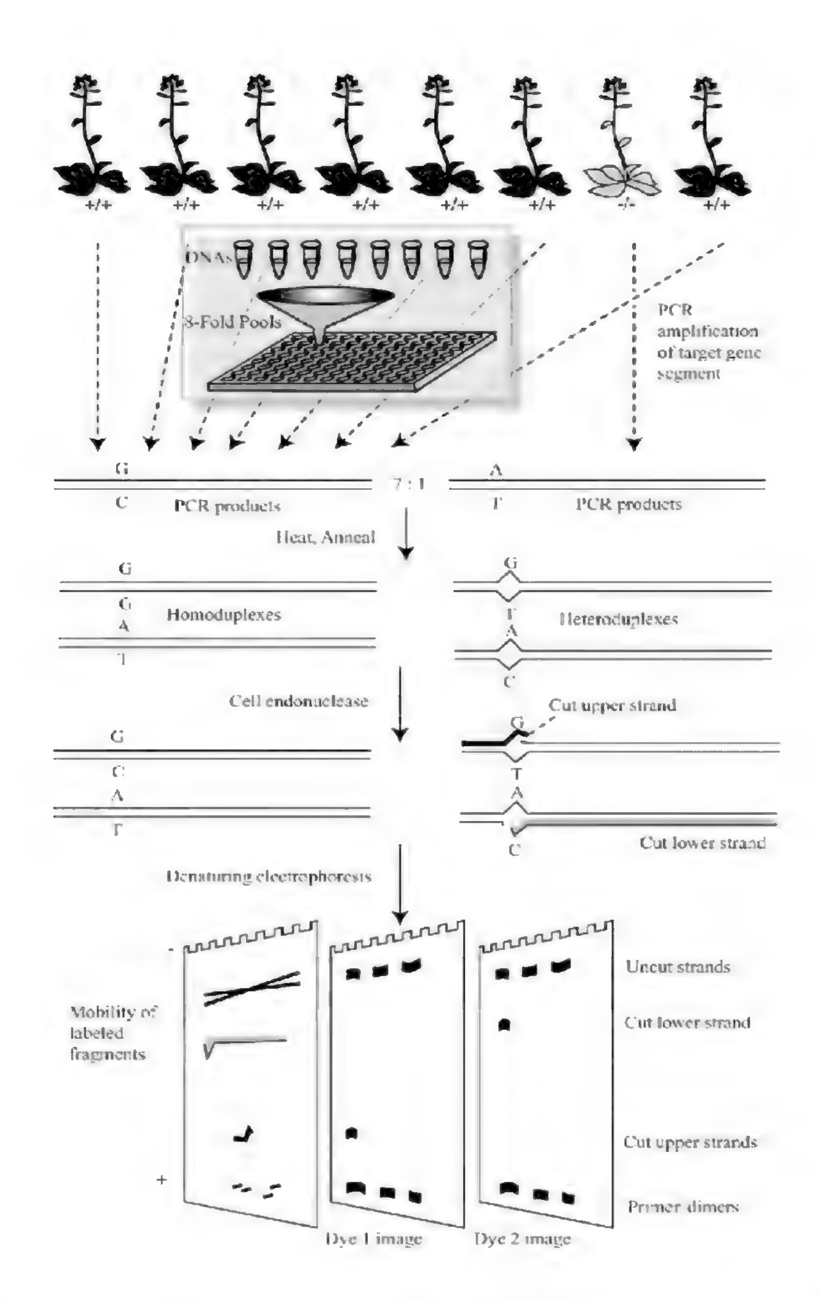
Detection of point mutation in DNA pools

بعد أن يتم عزل المادة الوراثية DNA من جميع أفراد الجماعة المطفرة وبشكل مستقل لكل عينة، تمزج عينات الـDNA في مجمعات pools كما هو موصوف سابقاً، (شكل 3)، وهي مرحلة مهمة وأساسية في كشف العينات التي تحتوي على طفرات نقطية للمورثة أو قطعة الـDNA الهدف المدروسة أو المضخمة ضمن المجمعات pools. إن عملية التضخيم للمورثة أو القطعة الهدف المدروسة تتم لهذه الـpools باستخدام شفع من البادئات Primers المناسبة لتضخيم هذه القطعة من خلال جهاز الـPCR. يعتبر تحليل الاختلافات المتقابلة ضمن شريطي الـDNA (مناطق عدم التطابق أو العرى المتشكلة) أو ما يسمى تحليل الازدواج غير المتجانس heteroduplex analysis من التقانات المتاحة حالياً لكشف التبدلات النكليوتيدية المفردة SNP والأكثر قابلية للتطبيق العملي من أجل إستراتيجية الـTILLING (شكل 6). يتبع مرحلة التضخيم باستخدام الـPCR مرحلة فصل الأشرطة المضاعفة لقطع الـDNA الناتجة وإعادة التحامها من جديد (denature and reanneal) ويتم ذلك من خلال عملية تسخين وتبريد لاحقة لعملية التضخيم ضمن الـPCR. إن قطع الـDNA المضخمة هي عبارة عن قطع DNA من المفترض أنها متماثلة من حيث التركيب

النكليوتيدي، ولكنها متشكلة (آتية) من أفراد مختلفة (4 -16 فرد كما ذكر سابقاً)، وقد تكون هناك فرصة لأن تكون قطع الــDNA المضخمة من DNA ناتجة عن أحد الأفراد الحاوية على تبدل نكليوتيدي (طفرة نقطية) ضمن قطعة الــDNA الهدف المضخمة (على اعتبار أن المادة المطفرة المستخدمة تسبب طفرات نقطية عشوائية على طول المجموع الوراثي، ولكن ليس بالضرورة أن تكون أفراد الجماعة المطفرة حاوية على نفس الطفرات النقطية وفي نفس الأمكنة على شريط الــDNA)، مما يعني أنه ضمن قطع الــDNA المضخمة في نفس الــpool سوف تحتوي على قطع DNA مشابهة للنمط الأصلي (البري غير المطفر) مع احتمال وجود تبدل نكليوتيدي مفرد (إن وجد). إن عملية فصل شرائط الــDNA وإعادة التحامها تسمح بارتباطات عشوائية بين السلاسل المتممة وبالتالي قد تلتحم سلاسل من قطع DNA مضخمة من أفراد حاوية على طفرة أو تبدل نكليوتيدي مع أخرى غير حاوية على تبدل نكليوتيدي (مشابهة للنمط البري غير الطافر ضمن القطع الهدف المضخمة)، مما يؤدي إلى حصول عدم تطابق mismatch في هذه المنطقة وتشكيل ما يشبه العروة loop في موقع الطفرة أو التباين. فعلى سبيل المثال إن حدوث طفرة نقطية وتبديل G/C بــA/T سينتج عنه قطع متخالفة ذات ازدواج غير المتجانس heteroduplex، وفيها يكون شريطي الــDNA متكاملان (متتامان) ماعدا موقع وجود التباين (مكان حدوث الطفرة في القطعة الهدف) وبالتالي ستكون من النمط G/T أو A/C (شكل 6)، (Henikoff and Comai, 2003) عند موقع الطفرة، في حين أن بقية قطع الــDNA سيكون فيها شريطي الــDNA متتامان بشكل كامل (G/C).

هنا كان لا بد من البحث عن طريقة يتم فيها كشف منطقة تشكل العروة أو عدم التطابق أوالتباين heteroduplex mismatched ضمن مزيج الــDNA (DNA pool) المذكور والتي يمكن من خلالها تمييز مناطق وجود الطفرات، آخذين بعين الاعتبار أنه كلما زادت نسبة المزج (الــpooling) فإن نسبة قطع الــDNA الحاوية على عدم مطابقة تنقص (على اعتبار أن نسبة هذه القطع هي 1/عدد العينات الممزوجة قبل عملية التضخيم في الــPCR) وبالتالي فإن نسبة قطع الازدواج غير المتجانس heteroduplex تنقص، والحساسية لكشفها تنخفض على اعتبار أن غالبية القطع ستحتوي على شرائط DNA متتامة.

فعلى سبيل المثال إذا كان معدل الطفرات المحدثة (التباينات) هو 100000/1 لكل نكليوتيد (كما ذكر سابقاً إن حدوث الطفرات هو حدث عشوائي على طول المجموع الوراثي للفرد المطفر، وهذه النسبة تعني وجود تبدل نكليوتيدي واحد كل 100000 شفع نكليوتيدي)، وكانت قطعة الـــDNA الهدف المدروسة بحجم 1000 شفع نكليوتيدي، فهذا يعني أن الطفرات (التبدلات النكليوتيدية) ستكون موجودة بمعدل طفرة كل 100 قطعة (أي أن كل 100 قطعة آتية من 100 فرد سوف تكون واحدة منها على الأقل حاوية على طفرة أو تبدل نكليوتيدي في المنطقة الهدف المضخمة)، وفي حالة كهذه فإن مزيج pool مؤلف من مزج ثمانية عينات آتية من ثمانية أفراد سيتطلب ما معدله 8/100 = 12.5 فحص أو اختبار (عند استخدام نسبة مزج 8) لكل طفرة في الدورة الأولى من الغربلة، بالإضافة إلى 8 محاولات (اختبارات) لإيجاد الطفرة في الفرد الحاوي عليها من أصل ثمانية عينات ممزوجة وآتية من ثمانية أفراد في الدورة الثانية، أو حوالي 20 محاولة لكل طفرة بشكل عام. أما الذهاب إلى نسبة أعلى من نسبة المزج (16 عينة ممزوجة آتية من 16 فرد) سوف ينقص الدورة الأولى إلى حوالي 16/100 = ~ 6 فحص (اختبار) لكل طفـــرة في الدورة الأولى من الغربلة، ولكن سوف يزيد محاولات الدورة الثانية إلى 16. يمكن القول بأن هناك تناسب ما بين معدل الطفرات وطول قطعة الـــDNA الهدف مع عدد المحاولات اللازمة لكل مزيج من أجل كشف الطفرات (Henikoff and Comai, 2003).



شكل 6: يبين كيفية مزج عينات الــDNA وتشكيلها لمنطقة عدم تطابق في حال وجودة الطفرة، تبدأ هذه المرحلة بمزج عينات الــDNA ضمن pools ثم إجراء تفاعل الــPCR، يليها مرحلة فصل قطع الــDNA المضخمة وإعادة التحامها مما يشكل عروة (في حالة وجود اختلاف أو طفرة نقطية)، يقوم بعدها أنزيم القص Cel I بقص منطقة عدم التطابق وتفصل القطع الناتجة على هلامة بولي أكريلاميد وباستخدام رحلان كهربائي.

7.5.2. طرق كشف التباينات النكليوتيدية المفردة (SNP) الموظفة من أجل تقانة الـــTILLING:

SNP Discovery Methods Adapted for TILLING

تم توظيف ثلاثة طرق لتحديد (اكتشاف) الطفرات المفردة أو النقطية لاستخدامها ضمن تقانة أو إستراتيجية الـــTILLING، وهي:

1. تحديد التتابع الكلي DNA Sequencing
2. تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء في الفصل DHLPC (denaturing high-pressure liquid chromatography)
3. تقانة القطع الأنزيمي للنكليوتيدات endonuclease cleavage المتبوعة بعملية رحلان كهربائي وباستخدام هلامة بولي أكريلاميد.

1.7.5.2. تحديد التتابع الكلي للـــDNA

DNA Sequencing

درست جدوى تطبيق تقانة تحديد التتابع النكليوتيدي الكلي على مورثات الأسماك المخططة zebrafish، إذ استخدم جهاز تحديد التتابعات النكليوتيدية الآلي ABI3700 DNA analyzer-96 capillaries، (ملحق 4) وقد قادت هذه التقانة إلى معلومات كافية عن التغيرات النكليوتيدية المختلفة (حذف وليس تبديل) الناتجة عن معاملة جماعات الأسماك المخططة بالمطفر ENU (ethyl-nitrosourea) وذلك لإيجاد سلسلة نظائر alleles مفيدة من المورثة *ragl* من خلال كشف الطفرات المحدثة ضمن هذه المورثة وهي طفرات من نوع missense (Nickerson et al., 2001 و Wienholds et al., 2002). إن الكلفة المرتفعة والمدة الزمنية الطويلة اللازمة لتحديد التتابعات النكليوتيدية الكاملة للمورثات الهدف ضمن الجماعات الكبيرة قادت إلى التفكير في طرق أو استراتيجيات أقل كلفة وأكثر كفاءة high-throughput وتوفيـــراً للجهـــد والوقت المبذولين لغربلة مـــورثة هدف ضمن جماعة مطفرة كبيرة العدد (10000 فرد مثلاً)، ومنها تقانة مزج عينات الـــDNA ضمن

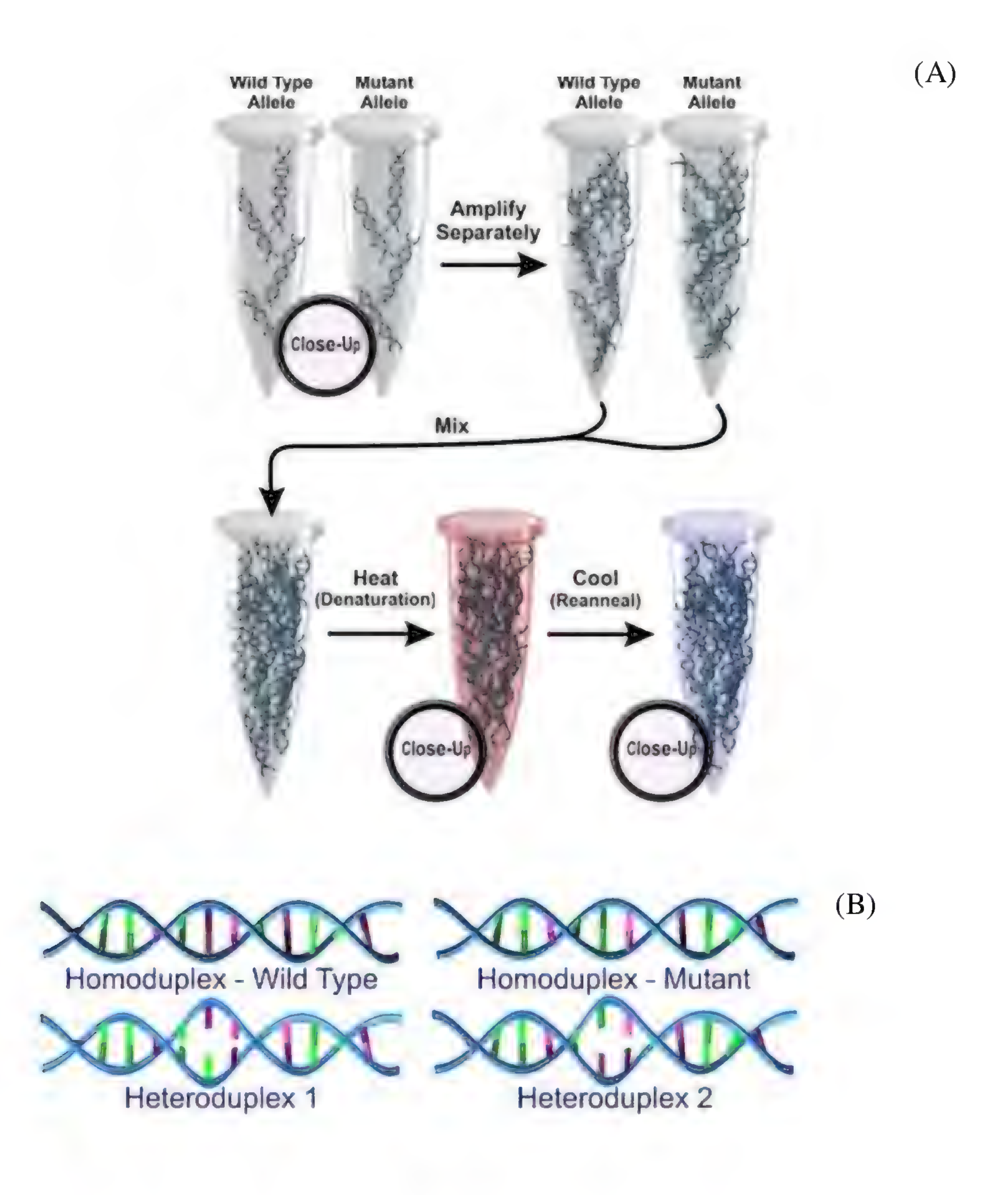
مجمعات pools ثم كشف التبدلات النكليوتيدية ضمن هذه المجمعات بالاستعانة بأحد الأنزيمات التقطيـــع الخاصة بقص الـــDNA في مناطق عدم المطابقة والموصوفة لاحقاً، مثل أنزيم Cel I الذي استخدم لدى دراسة جماعة مطفرة من الأسماك المخططـــة zebrafish (Murphey and Zon, 2002).

2.7.5.2. الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء في الفصل DHPLC

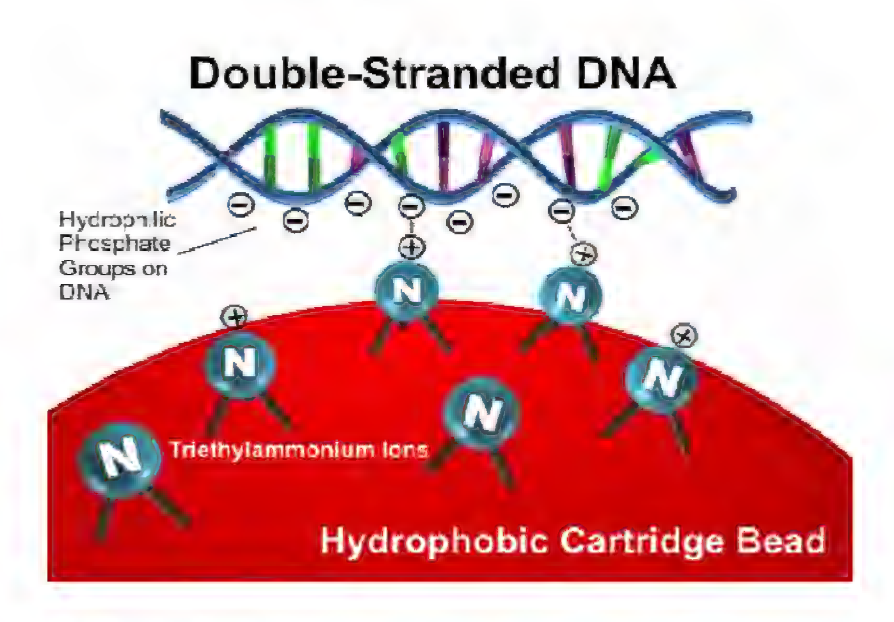
Denaturing High Performance Liquid Chromatography

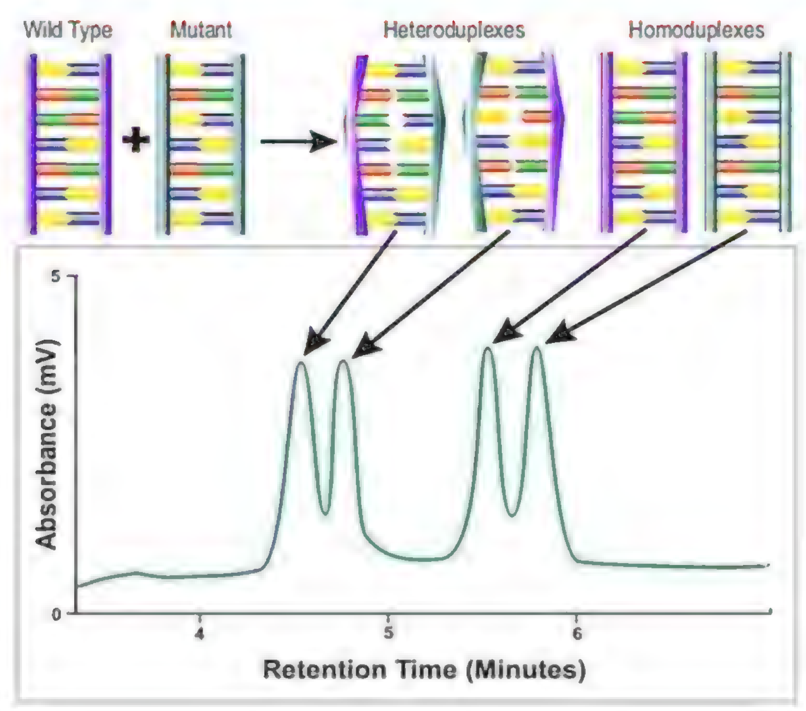
كان كل من (Bentley et al., 2000) و(McCallum et al., 2000) أول مـــن استخـــدم تقانـــة الكروماتوغرافيـــا السائلـــة عاليـــة الأداء فـــي الفصـــل Denaturing High Performance Liquid Chromatography DHPLPC (Underhill et al., 1997) في كشف التغيرات النكليوتيدية (الطفرات النقطية) المحدثة، وهي تقانة تعتمد في مبدئها على استخدام الحالة العكسية للكروماتوغرافيا السائلة reverse-phase liquid chromatography، وفيها يتم حل وسط معين في مذيب قطبي في مضخة وضمن عمود ذو حزم كارهة للماء hydrophobic solid. إن مبدأ هذه التقانة يعتمد بشكل أساسي على درجة الحرارة اللازمة لفصل شريطي الـــDNA، ففيها تستخدم درجة حرارة أقل من تلك اللازمة لفصل شريطي الـــDNA للقطعة الهدف المدروسة ولكن بحيث تكون كافية لفصل شريطي الـــDNA للقطعة الهدف في مزيج من قطع الـــDNA (DNA pool) والتي قد تحتوي على مناطق تشكل العرى (عدم المطابقة mismatch)، وعلى اعتبار أن درجة الحرارة اللازمة لفصل شريطي قطعة الـــDNA التي تحتوي على مناطق عدم المطابقة هي أقل من تلك اللازمة لفصل القطع التي لا تحتوي عليها (تعتمد درجة الحرارة اللازمة لفصل شريطي الـــDNA على عدد الأسس الآزوتية ونسبة هذه الأسس C/G وT/A، إذ تزداد درجة الحرارة اللازمة بزيادة نسبة C/G وذلك بسبب وجود ثلاثة روابط هيدروجينية بين G وC في حين توجد اثنتان بين A وT)، وبالتالي تمر هذه القطع (الشرائط المفصولة) أولاً ضمن عمود الفصل (DHPLC column) والتي ستظهر كقمة أمامية وستخرج (ستمر ضمن عمود

الفصل) أسرع من القطعة التي تحتوي على شريط مضاعف والتي بالضرورة لا تحتوي على عرى، والتي هي بالنتيجة التي تحتوي على تبدل نكليوتيدي نقطي، (شكل 7).



(C)





شكل 7: يوضح الشكل مبدأ استخدام الـــDHPLC لكشف التباينات النكليوتيدية المفردة. (A) تبدأ العملية بمزج عينات الـــDNA وتطبيق تفاعل الـPCR على المورثة أو المورثات الهدف المراد غربلتها لكشف الطفرات، تليها مرحلة تسخين لفصل شريطي قطع الـــDNA

المضخمة ثم مرحلة تبريد بطيء يسمح بإعادة التحامها، مما يشكل عروة أو منطقة عدم تطابق في حال وجود الطفرة في أحد عينات الــDNA الممزوجة.

(B) يبين مبدأ ارتباط جزيئات الــDNA ضمن عمود الفصل.

(C) مرحلة تحليل هجرة عينات الــDNA (التي تحتوي على عرى أو مناطق عدم تطابق والتي لا تحتوي عليها) وتشكيل منحني تظهر فيه قطع الــDNA التي تحتوي على عرى أولاً نتيجة هجرتها بشكل أسرع ضمن عمود الفصل. إذ يوضح الشكل كيفية ظهور المنحني والذي يمثل العينات التي تحتوي على منطقة عدم تطابق أو عروة نتيجة الاختلاف بين النكليوتيدين المتقابلين والعينات التي لا تحتوي عليها. تعتبر الحرارة اللازمة لفصل قطع الــDNA المتخالفة (التي تحتوي على منطقة عدم تطابق) أقل من تلك اللازمة لفصل القطع العادية وبالتالي تهاجر قطع الــDNA (الأولى، الظاهرة إلى اليسار) بشكل أسرع من قطع الــDNA العادية (الثانية، الظاهرة إلى اليمين)، وعليه يمكن التفريق بين قطع الــDNA المضخمة ضمن تفاعل الــPCR والتي تحتوي على طفرة نقطية من تلك التي لا تحتوي عليها.

طبقــت تقانة DHPLC على جماعة مطفرة عنــد نبات الــ*Arabidopsis* وذلك لغربلــة الطفــرات عند قطع DNA تتــراوح في أطوالها من 345 وحتى 900 شفع نكليوتيدي، وفيها كانت مجمعات الــDNA (DNA pools) تحتــوي علـــى مزيج من خمــسة عينات DNA، وقد أعطت 4 طفــرات مختلفــة (2missenese و silent و truncation) ضمــن التسلســل النكليوتيدي لمورثتين هما *CHROMOMETHYLASE2* و *CHROMOMETHYLASE3* (*CMT2* and *CMT3*) (McCallum et al., 2000). كما استخدمت هذه الطريقة أيضاً عند جماعة ذبابة الفاكهة *Drosophila*، إذ تم غربلة قطع الــDNA الناتجة والتي كان طولها 350 شفع نكليوتيدي من DNA معزول من ذكور الذبابة *Drosophila*، وقد أعطت 16 طفرة مختلفة من نمطي missense و silent في مورثة *awd* (Bentley et al., 2000). علماً أنه لم تسجل أية أخطاء إيجابية في كشف الطفرات المذكورة باستخدام تقانة DHPLC في كلا الدراستين.

3.7.5.2. تقانة القطع الأنزيمي للنكليوتيدات

Endonuclease cleavage (High-Throughput TILLING)

إن التحدي في تقانة الــDHPLC يكمن في الحصول على درجة الحرارة المناسبة واللازمة للتفريق بين قطع الــDNA (الحاوية على طفرات) ضمن العينات الممزوجة والمضخمة بوساطة الــPCR من تلك التي لا تحتوي على طفرات (Henikoff and Comai, 2003)، وهي غالباً ما تكون فروقات صغيرة وتحتاج إلى وقت طويل لتحديدها. قادت هذه الصعوبة إلى تطوير طريقة فعّالة لكشف قطع الــDNA المتخالفة ذات الازدواج غير المتجانس (الــheteroduplex) بالاعتماد على استخدام خاصية القص الأنزيمي التي تملكها بعض أنزيمات القص لمناطق عدم التطابق mismatch (المشكلة للعروة) ثم فصل القطع الناتجة عن عملية القص بوساطة رحلان كهربائي.

في طريقة الــTILLING العالية الكفاءة high-throughput يتم قص القطع المتخالفة ذات الازدواج غير المتجانس الــheteroduplex (في منطقة عدم المطابقة) بوساطة أنزيم Cel I (Oleykowski et al., 1998)، يقوم هذا الأنزيم بقص قطع الــDNA عند الطرف 3' في منطقة العروة، (شكل 6) يتم بعدها تحميل القطع الناتجة عن عملية القص الأنزيمي ضمن هلامة فصل ومن خلال عملية رحلان كهربائي، تحلل بعدها الهلامة الناتجة لينتج عنها ظهور عصابتين قصيرتين بلونين مختلفتين ناتجتين عن القص الأنزيمي في حال وجود طفرة (تبدل نكليوتيدي، عدم مطابقة)، ناتجة عن استخدام بادئتين مختلفتي اللون (من حيث الفلورة المستخدمة) في عملية تضخيم قطعة الــDNA الهدف ومن خلال جهاز الــPCR، كل بادئة من طرف، بالإضافة إلى عصابة كبيرة تحتوي على اللونين معاً وهي عبارة عــن القطع غير المقطّعة (المقصوصة بالأنزيم). هذا وإن مجموع حجم القطعتين القصيرتين يجب أن يكون مساوياً للقطع الأصل وذلك على اعتبار أن هاتين القطعتين ناتجتين عن عملية القص الحاصلة للقطعة الأصل (شكل 6). إن ميزة هذه التقانة أنها تؤدي إلى كشف مواقع الطفرات التي تظهر بشكل مباشر على الهلامة، وهي ميزة مهمة لهذه التقانة على التقانات الأخرى، مثل الــDHPLC والرحلان الكهربائي الشعري ذو

الحرارة المتدرجة Temperature-Gradient Capillary Electrophoresis (TGCE) لأنه يوضح ويثبت بشكل نهائي تحديد التتابع النكليوتيدي، خاصة من أجل قطع الــDNA المتخالفة ذات الازدواج غير المتجانس (الــheterozygotes)، بوساطة قص المنطقة التي يمكن أن توجد فيها الطفرات، (Hsia et al., 2005). تملك هذه الطريقة ميزة أخرى على طريقة الــDHPLC إذ أن حجم القطعة الهدف المدروسة هنا ليس محدداً لحساسية الكشف.

1.3.7.5.2. أنزيم القص Cel I

تعتبر الأنزيمات النووية nucleases مهمة لجوانب عديدة من الوظائف الخلوية في جميع الكائنات الحيــة (Linn et al., 1993)، بعضها على درجــة عالية من التخصص من إعادة ضم الــDNA (DNA recombination)، التضاعــف replication، الإصلاح repair، كما توجــد أنزيمات أخــرى من أجل تقطيع الحمــوض النوويــة بشكل عام. ومنها الأنــزيمات الموجــودة ضمن النوى الخلــوية عنــد نوع الفول mung bean (mung bean nuclease MBN)، (Kowalski et al., 1976 و Kowalski et al., 1988)، وأنزيم S_1 (Shenk et al., 1975)، وأنزيم P_1 (Maekawa et al., 1991) وأنزيم *DNaseI* البنكرياسي (pancreatic DNaseI) (Lacks, 1981)، وعلى أية حال فإن الوظائف البيولوجية للعديد من الأنزيمات النووية لم يتم الكشف عنها بعد.

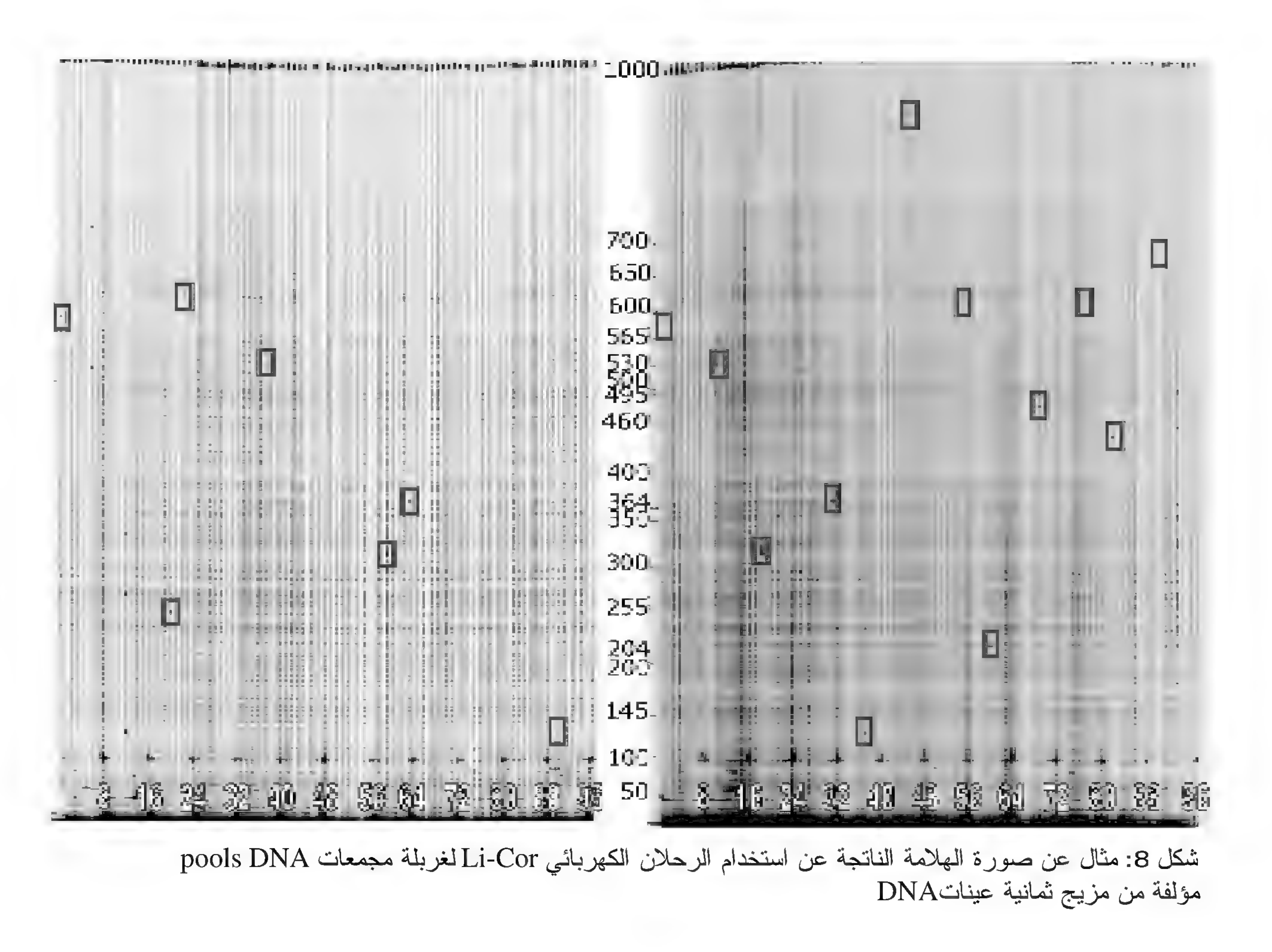
مؤخراً، تم اكتشاف عائلة أو مجموعة جديدة من الأنزيمات النووية التي تميز مناطق العرى أو عدم التطابق mismatch specific endonucleases في النباتات (Oleykowski et al., 1998)، وتوجد هذه الأنزيمات بشكل وافر في أنسجة مختلفة عند أجزاء النبات مثل الجذور، والسوق، والأوراق، والأزهار، والثمار. تمتلك هذه الأنزيمات القدرة على الاتحاد مع ConA (Concanavalin A وهو بروتين Lectin). كما تعتبر شوارد الزنك Zn^{2+} ضرورية لنشاط الأنزيم أما شوارد المغنيزيوم Mg^{2+} فهي أيضاً ضرورية مــن أجل القص النكليوتيــدي للــDNA (DNA nicking) عنــد الطرف '3 لقطع عدم المطابقة. أحد الأنزيمات النووية المعزولة مــن نبات الكرفس celery ويدعى بــCel I كان قد استخــدم من أجل تطويــر تقانة كشــف الطفرات المعتمدة على المواد

المعلمة بالفلـــورة fluorescence-based mutation detection assay والتـــي هـــي فعالـــة بشكل كبير مـــن أجل كشف التباينات الناتجـــة عن كلٍ من طفـــرات الحذف والإدخال والتبـــديل (insertion/deletion and base-substitution mismatches)، (Oleykowski, 1998).

يعتبـــر أنزيم Cel I كعضو من عائلة الأنزيمات S_1، وهي مجموعة من أنزيمات القص ذات الفعالية في قص الشريط المفرد من جزئيات الـــDNA والـــRNA كم ذكر، وبشكل عام تكون فعاليتها في تقطيع الـــDNA هي أكبر بخمس مرات من فعاليتها في تقطيع الـــRNA. على الرغم من أن فعاليتها تتركز في تقطيع الشرائط المفردة، ولكن مع ذلك يمكن أن تقوم بقص في أحد شريطي الـــDNA أو هجين الـــDNA-RNA. يستخدم هكذا نوع من الأنزيمات في البيولوجيا الجزيئية في إزالة نهاية الشريط المفرد من جزئية الـــDNA لتشكيل نهاية مفتوحة وفتح العرى loops المتشكلة أثناء تركيب الشريط المضاعف من الـــcDNA. تسمح طريقة استخدام أنزيم Cel I بكشف قطع الـــDNA المتخالفة ذات الازدواج غير المتجانس heteroduplex في مزيج pool مؤلف من ثماني عينات أو أكثر من أجل الطفرات المحدثة بـــوساطة مادة EMS في تقانة الـــTILLING (شكل 6)، كان قد استفيد من خاصية هذا الأنزيم وتم تطويرها لكشف الطفرات عند جماعة الـــ*Arabidopsis*، وذلك عن طريق تضخيم قطع DNA ضمن تفاعل الـــPCR وذات أحجام 1000 أساس قاعدي وباستخدام بادئات معلمة labeled primers، وفصل القطع الناتجة ضمن هلامه بولي أكريلاميـــد وباستخدام جهاز رحلان كهربائي LI-COR (LI-COR, Lincoln, NE). (Till et al., 2003a و Colbert et al., 2001)، (شكل 8).

تعتبر التقانات الثلاثة السابقة واعدة لاستخدامها في كشف الطفرات، وكان قد تم تطويـــر تقانات أخرى، مثل تقانة الرحلان الشعـــري ذو درجات الحرارة المتدرجة (TGCE) كما ذكر سابقاً، والتـــي هي متاحة الآن بشكل تجـــاري كأجهزة شعـــرية مضاعفة (Li et al., 2002)، كما يتم إجراء أبحاث لتطوير الـــDHPLC وتحسينها (Premstaller et al., 2002). أكثر من ذلك فقد أصبحت تقانة الـــmass spectrometry

شائعـــة بشكل متزايد من أجل تحـــديد النمط الوراثي بطـــريقة سريعة وعاليـــة الكفاءة rapid high-throughput genotyping (Bray et al., 2001)، ومن الممكن تعديلها لتصبح موظفة بشكل جيد من أجل أهداف تقانة الـــTILLING. على أية حال يجب الأخذ بعين الاعتبار الكلفة المادية والاقتصادية التطبيقية لهذه التقانات المتطورة، إذ أنها تتطلب معدات غالية الثمن، ومعدل الأخطاء في عمليات الكشف والتحليل يجب أن تكون محددة. لقد لوحظ أن الأخطاء الايجابية لهكذا نوع من التقانات هي منخفضة (Greene et al., 2003)، أبعد من ذلك فإن الحاجة لتضخيم الـــPCR كخطوة أولى هي ضرورية لكل الطرق والتقانات المذكورة، كم يجب التركيز على تقانة الفصل التي يمكن أن تكون محسنة بشكل أساسي علاوة على الكفاءة أو الكلفة الفعلية أو المؤثرة.



شكل 8: مثال عن صورة الهلامة الناتجة عن استخدام الرحلان الكهربائي Li-Cor لغربلة مجمعات pools DNA مؤلفة من مزيج ثمانية عيناتDNA

يظهــر الشكل 8، (Henikoff and Comai, 2003) مثال عــن صورة الهلامة الناتجة عن استخدام الرحلان الكهربائي LI-Cor لغربلة مجمعات pools مؤلفة من مزيج ثماني عينات، وهو جزء من مشروع استخدام تقانة الــTILLING على نبات الــ*Arabidopsis* (The Arabidopsis TILLING Project ATP). يتصل جهاز الرحلان LI-COR مع برنامج وحاسوب الكتروني يتم من خلاله تحليل الهلامة الناتجة عن عملية الرحلان وإظهار العينات على شكل حزم وعصابات عالية (حسب طول قطعة الــDNA المضخمة)، أما الطفرات فإن وجدت فهي تظهر على شكل عصابات منخفضة (ذات وزن جزيئي أقل من تلك التي للعصابات الكاملة) على الهلامة ناتجة عن عملية القص المستخدمة في هذه التقانة. يقوم البرنامج الالكتروني الموجود على الحاسب بتحليل الهلامة وإظهار النتائج ضمن صورتين، تظهر على الصورة الأولى عصابات القطعة المضخمة بالإضافة إلى العصابات الناتجة عن عملية القص والمتصلة بالبادئة الأمامية R-primer، في حين تظهر على الصورة الثانية عصابات القطعة المضخمة أيضاً بالإضافة إلى العصابات الناتجة عن عملية القص والمتصلة بالبادئة العكسية L-primer. ففي هذا الشكل تظهر صورتين لهلامة واحدة مع سبعة طفرات مختلفة تم كشفها على جماعة الــ*Arabidopsis*، ففي الجماعة المدروسة حدد فريق الــTILLING سبع طفرات (الصناديق السوداء) في صورة الهلامة الظاهرة على اليسار مع سبع طفرات مقابلة لها على الصورة الأخرى.

2.3.7.5.2. مرحلة تحديد التتابع النكليوتيدي

DNA Sequencing

بعد تحديد الــPool الحاوي على العينة التي تملك طفرة، يتم تضخيم العينات (PCR) ضمن هذا الــpool بشكل إفرادي (كل عينة على حدة) بعد مزجها مع النمط البري (غير المطفر) لمعرفة أية عينة بالتحديد من العينات الممزوجة تحتوي على الطفرة المكتشفة. كذلك يتم استخدام أنزيم القص هنا للكشف عن منطقة العروة (عدم

التطابق)، ثم تمرير العينات ضمن هلامة بولي أكريلاميد ويتم إجراء عملية رحلان كهربائي. بعد ذلك يُعمد إلى تحديد التتابع النكليوتيدي لعينة الـــDNA الحاوية على الطفرة المكتشفة لتحديد موقع ونوع الطفرة ضمن التتالي النكليوتيدي لقطعة الـــDNA أو المورثة الهدف المدروسة.

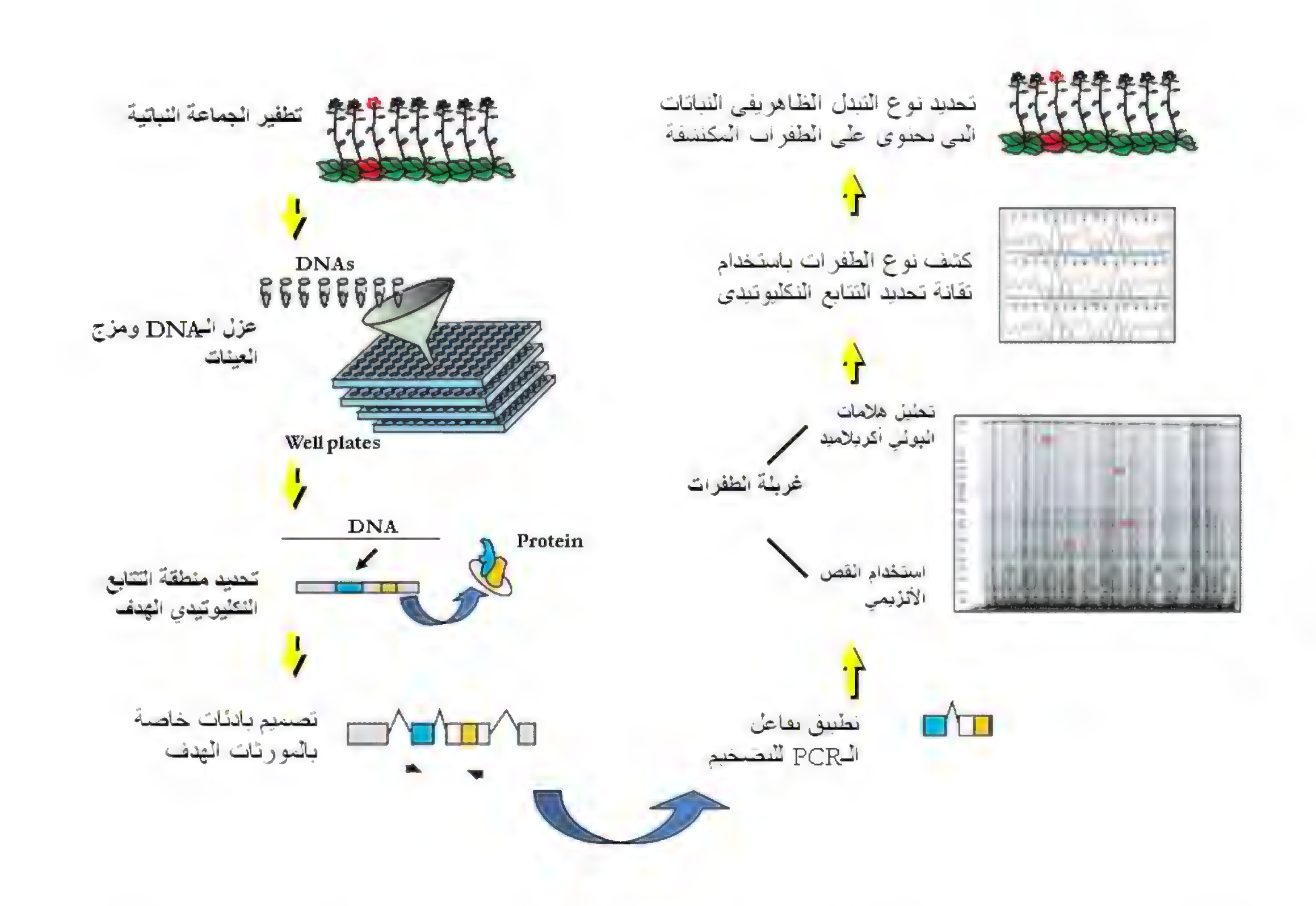
8.5.2. من النمط الوراثي إلى النمط الشكلي

Genotype to Phenotype

إن النمط الشكلي phenotype هو السمة المكتسبة أو الصفة المميزة للمتعضية كالنمط التطوري أو الحيوي الكيميائي أو الصفات الفيزيولوجية أو السلوك، الخ... ينتـــج النمط الشكلي عن تعبير مورثات المتعضية أو الكائن الحي وكذلك عن تأثير العوامل البيئية ومن المحتمل عن التأثير المتبادل بينهما (Churchill, 1974)، أما النمط الوراثي genotype للكائن الحي فهو المعلومات الوراثية المحمولة على الـــDNA ضمن ما يسمى بالشيفرة الوراثية genetic code. لا تملك المتعضيات التي لها نفس النمـــط الوراثي بالضرورة نفـــس ردة الفعل act أو المظهر look لأن المظهر والسلوك قد يتغيران أو يتأثران بالظروف البيئية والتطورية. وبشكل مشابه ليست كل المتعضيات التي تكون متشابهة ظاهرياً تملك نفس النمط الوراثي (Johannsen, 1911).

في تقانة الـــTILLING، يلي مرحلة تحديد الطفرات وغربلتها ضمن الجماعة المدروسة عملية التحليل الشكلي phenotypic analysis للعينات الحاوية على طفرات نقطية ضمن المورثة الهدف، ولهذا الغرض يدرس النمط الشكلي على النباتات المزروعة من بذور الجيل المطفر الثاني M_2 (أو الثالثM_3 الناتجة من نباتات الجيل المطفر الثاني). تليها مرحلة كشف الطفرات على الهلامات وباستخدام عمليات الرحلان الكهربائي وتأكيد وجود الطفرات النقطية في العينات المفردة المشكلة للمجمعات pools، ثم معرفة نوع الطفرة المحدثة وذلك بتحديد التتابع النكليوتيدي لقطع الـــDNA الحاوية على هذه الطفرات النقطية، ومعرفة نوع الطفرة وبالتالي معرفة التغيير اللاحق الذي

يؤدي إلى تعديل في الحمض الأميني المكّون للبروتين الناتج عن المورثة أو المورثات الهدف المدروسة، تتم عملية الرجوع إلى النبات أو الفرد الحاوي على الطفرة المحدثة والمكتشفة ضمن المورثات الهدف المدروسة وزراعته ثم مقارنة التغيرات الظاهرية الناتجة عن وجود الطفـــرة النقطية في المورثات المدروســـة في النبات مقارنةً مع النبات الفرد أو الأصلي الذي لا يحتوي على الطفرات (غير المطفر)، وهو ما يسمى بتحليل النـــمط الشكلي phenotype analysis، وهنا يجب الانتباه إلى مسألة مهمة وهي أنه بالإضافـــة إلى النبات أو الفرد المكتشف فيـــه الطفرة المحدثة يحتوي النبات أو الفرد الطافر على طفرات نقطيـــة عديدة موزعة علـــى كامل المجمـــوع الوراثي genome لهذا الفرد، وبالتالي قد يكـــون مرد بعض التغيرات الشكلية إلى طفرات أخرى على النبات المحدد عليه الطفرة النقطية للمورثة الهدف المدروسة، (شكل 9)، (Comai and Henikoff, 2006).



شكل 9: مخطط إستراتيجية تقانة TILLING بشكل عام عند نبات الـــ Arabidopsis باستخدام طريقة القص الأنزيمي

6.2. تقانة استهداف التباينات النكليوتيدية الموضعية الطبيعية ضمن المجاميع الوراثية EcoTILLING

تم تطبيق خطوات تقانة الـTILLING على عينات DNA معزولة من عضيات غير مطفرة وقد أطلق عليها هنا تقانة الـEcoTILLING، فالفرق بينها وبين تقانة الـTILLING هو أن هذه التقانة تُستخدم للكشف عن التباينات النكليوتيدية الصغيرة (من 1 -8 تبدلات نكليوتيدية من نوع تبديل أو إضافة أو حذف) الطبيعية وغير المحدثة، (Comai et al, 2004 و Coassin et al., 2008 و Barkley and Wang, 2008)، ويتم ذلك بمزج عينات DNA من أفراد مختلفة لكشف التباينات فيما بينها ضمن المورثة أو المورثات الهدف المدروسة. تمكّن هذه الطريقة من كشف التباينات النكليوتيدية ضمن المورثات الهدف عند الأفراد بدون الحاجة إلى تحديد التتابع الكلي لأسس الـDNA للمورثة أو المنطقة الهدف لكل الأفراد المدروسة أو المراد كشف نظائر مورثة معينة ضمنها، إذ يتم فيما بعد تحديد التتابع النكليوتيدي لـDNA الأفراد التي تحتوي على مناطق عدم مطابقة فقط، بينما لا داعي لتحديد التتابع النكليوتيدي للأفراد التي لم تعط مناطق عدم مطابقة، إذ أن عدم وجود مناطق عدم مطابقة أو قطع قص بين هذه الأفراد يدل على أن الـDNA ضمن المنطقة المدروسة لا تحتوي على تباينات نكليوتيدية، (Comai et al, 2004 و Mejlhede et al, 2006). تم استخدام تقانة الـEcoTILLING لتحديد النظائر المختلفة عند المورثات المقاومة للبياض الدقيقي (مورثتي *Mlo* و *Mla*) عند نبات الشعير، (Mejlhede et al, 2006)، كما استخدمت لكشف التباينات النكليوتيدية عند كل من الحمضيات (Talon1 and Gmitter, 2008)، والإنسان (Till et al., 2006 و Triques et al., 2008)، والـ*Arabidopsis*، (Till et al., 2004b)، والرز (Collard et al., 2008)، وعند بعض الأنواع العشبية، (Weil, 2009)، وعند نبات البطيخ melon (Nieto et al., 2007).

7.2. البرمجيات المستخدمة في تقانة الــTILLING

Software applied for TILLING technique

1.7.2. توقع التغيرات في الحموض الأمينية التي تؤثر على وظيفة البروتين (SIFT)

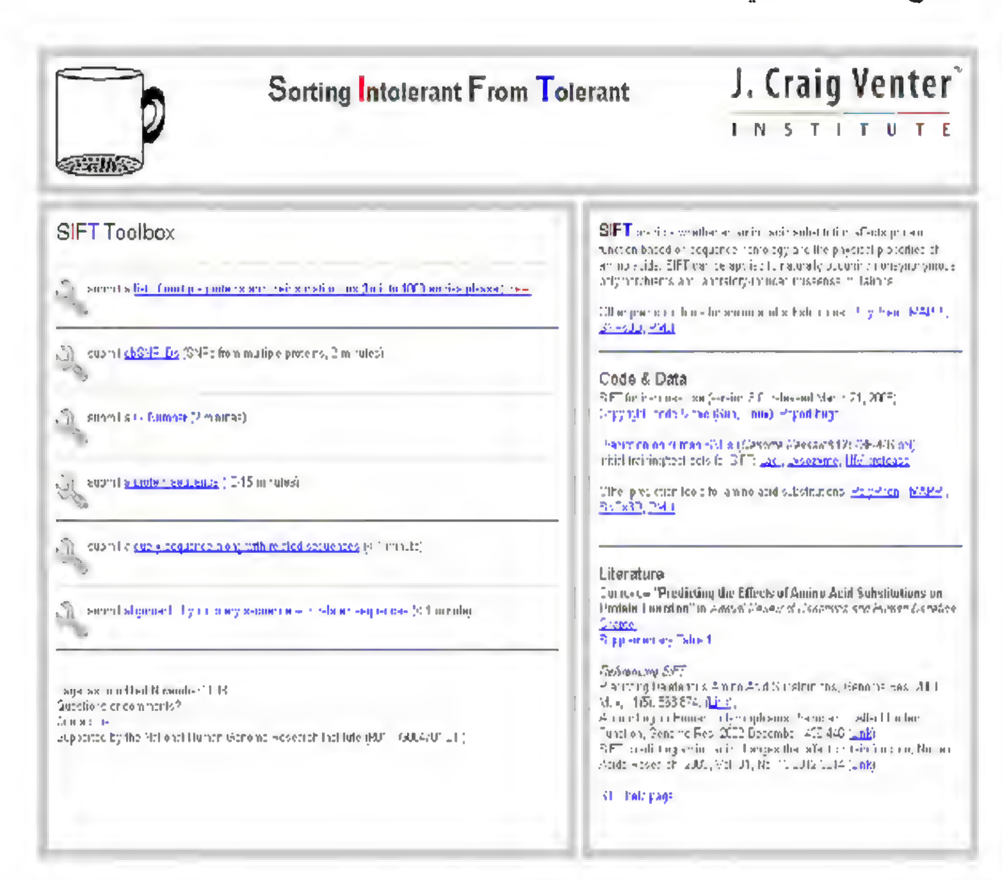
Predicting amino acid changes that affect protein function

تلعب التغيرات أو التبدلات النكليوتيدية المفردة دوراً مهماً فيما يخص تأثيرها لاحقاً على وظيفة البروتينات الناتجة عن المورثات التي قد يحصل فيها التبدل النيكلوتيدي المذكور (يختلف التأثير حسب نوع التبدل النيكلوتيدي ونوع الطفرة الناتجة كما هو مذكور سابقاً)، إذ أنه على سبيل المثال، أكثر من نصف الأمراض عند الإنسان تعود إلى تبدلات نكليوتيدية مفردة SNPs والتي تغير في الحموض الأمينية الناتجة عن المورثات التي تحصل فيها هذه التبدلات وبالنتيجة تغيّر في صفات ووظيفة البروتينات المترجمة مؤدية إلى حدوث المرض (حسب نوع وطبيعة ووظيفة البروتين الناتج عن الترجمة) (Krawczak et al., 2000 و Ng and Henikoff, 2003).

بسبب هذه الأهمية الكبيرة للتبدلات النيكلوتيدية المفردة، تم تطوير برنامج SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)، وهو عبارة عن برنامج حاسوبي يعتمد على البحث ضمن بنوك المورثات ومقارنة التتابعات النيكلوتيدية من أجل التنبؤ فيما إذا كانت هذه التبدلات النكليوتيدية (في حال حدوثها) سوف تؤثر على وظيفة البروتين وبالتالي قد تعكس هذه التغيرات في البروتين تبدلاً على النمط الشكلي أو الوظيفي (Ng and Henikoff, 2002 و Ng and Henikoff, 2003).

كان قد تم تطبيق هذا البرنامج على قاعدة بيانات للتنوع البشري، وقد كان قادراً على تمييز التبدلات النيكلوتيدية الطبيعية، إذ أن 69% من الطفرات الطبيعية كانت مسؤولة عن أمراض مختلفة (باعتبار أن المرض قد ينتج عن تغير في وظيفة البروتين نتيجة التبدل في الحموض الأمينية وبسبب التبدل النيكلوتيدي الحاصل)، (Bairoch and Apweiler, 2000).

تقوم وظيفة برنامج SIFT، (شكل 10) على التنبؤ فيما إذا كان التبدل النيكلوتيدي سوف يؤثر على وظيفة البروتين أم لا، وذلك من خلال اعتبار كل موقع نكليوتيدي هو عرضة للتبدل ثم معرفة ما هو التغير في الحمض الأميني (المحتمل) نتيجة هذا التبدل، بعد ذلك يقوم هذا البرنامج بالبحث ضمن بنوك المورثات عن التشابه والصلة بين البروتين المدروس وتغير الحمض الأميني المحتمل الناتج عن التبدل النيكلوتيدي في كل موقع نكليوتيدي ضمن المورثة المدروسة وكذلك التغير المعروف في وظيفة البروتينات المشابهة (homology) بالتتابع النيكلوتيدي وما حصل من تغير مشابه وتبدل وظيفي للبروتين، إذ يقوم البرنامج بحساب احتمالية الطفرات النقطية عند كل موقع لحمض أميني.



شكل 10: صفحة برنامج SIFT على الانترنت (http://sift.jcvi.org)

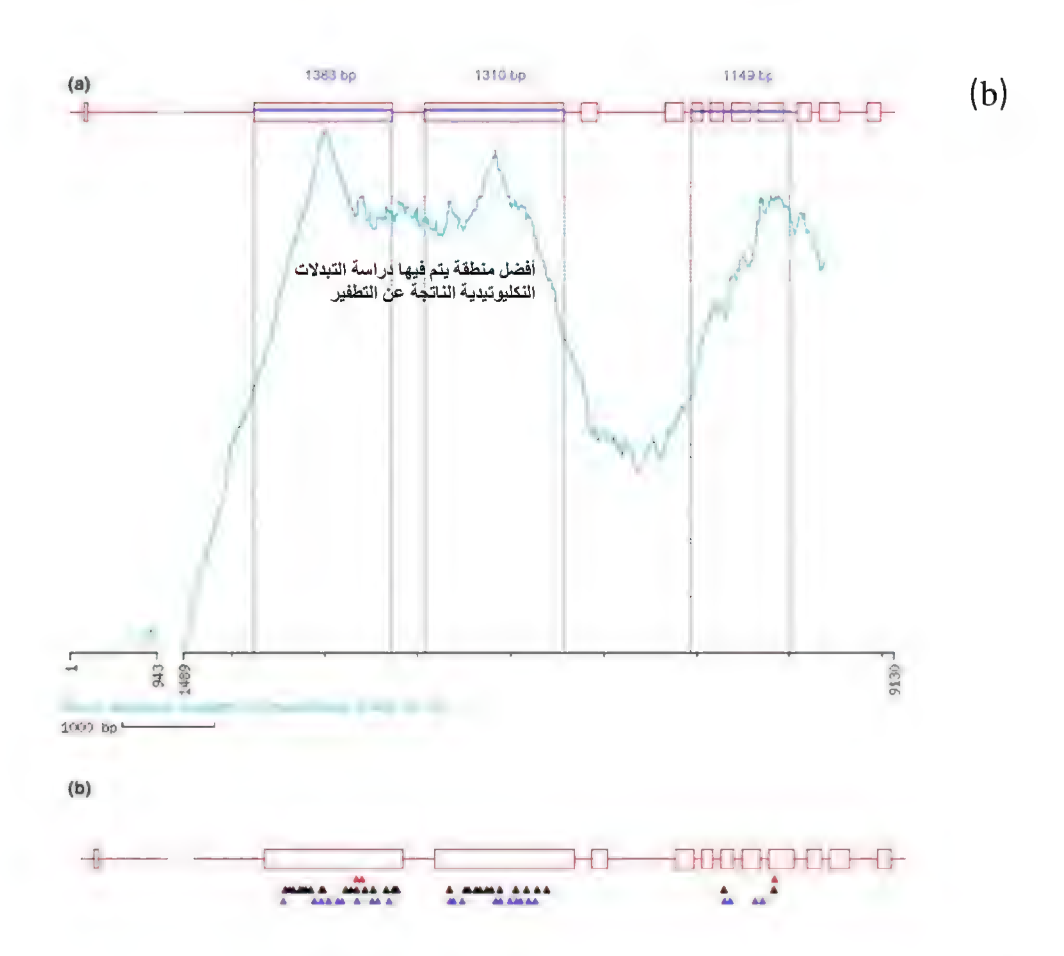
2.7.2. برنامج CODDLE

CODDLE (Codon Optimized to Detect Deleterious Lesions)

(**C**hoosing c**o**dons to **O**ptimize **D**iscovery of **D**eleterious **LE**sions) أو ما يعرف اختصاراً بــCODDLE، هو عبارة عن برنامج حاسوبي يقوم بتحديد مواقع الطفرات النقطية التي من المرجّح أن تؤدي إلى حدوث ضرر على وظيفة المورثة المراد دراسة تأثير التغيرات النكليوتيدية المحدثة عليها (حسب نوع الطفرة النقطية الناتجة، كما ذكر سابقاً). يقوم هذا البرنامج بتوقع (تنبؤ) جميع التبدلات النكليوتيدية الممكنة ضمن منطقة الــDNA الهدف، تلك التبدلات التي ينتج عنها أضرار أو تثبط وظيفة المورثة (كالطفرات). وبالتالي يمكن استخدام هذا البرنامج في تصميم بادئات للمورثات أو المناطق من الــDNA المراد دراستها ضمن تقانة الــTILLING. كما يمكن استبعاد غربلة تلك المناطق التي لا يتوقع حصول طفرات مفيدة أو ايجابية (كتلك التي تغير في وظيفة البروتين) وكذلك استبعاد مناطق الانترونات introns (تلك المناطق من المورثة التي لا تشارك في عمليات النسخ والترجمة إلى بروتينات)، (http://www.proweb.org/coddle)، (شكل11).

(a)

(b)



شكل 11: (a) يبين مثالاً عن كيفية تحليل برنامج CODDLE للمعلومات المعطاة عن المورثة الهدف المطلوب تحديد الطفرات النقطية المحتملة ضمنها، وكذلك كيفية إظهار التأثيرات أو التبدلات المتوقعة على الحموض الأمينية المترجمة من التتالي النكليوتيدي للمورثة المدروسة، تحتوي المورثة الهدف هنا على مناطق انترونات واكسونات مختلفة، يقوم البرنامج بتحديد المناطق الأكثر عرضةً للتغيرات أو التبدلات النكليوتيدية الفاعلة (التي تغير في الحموض الأمينية)، وبالتالي يمكّن هذا البرنامج لاحقاً من تصميم البادئات المستخدمة في تفاعل الـــPCR لتقوم بتغطية المناطق التي يكون فيها احتمال التبدل كبيراً بدون الحاجة إلى غربلة (فحص) التتالي النكليوتيدي لكامل المورثة الهدف (قد تكون بعض المورثات كبيرة الحجم، إذ باستخدام هذا البرنامج يمكن دراسة وتحديد

الطفرات النقطية عند بعض أجزاء المورثة، تلك الأجزاء التي يكون فيها توقع التغيرات أو الضرر في الحموض الأمينية كبيراً)

(b) يبين مثالاً عن أحد المورثات التي تم استخدامها فعلياً ضمن تقانة الـTILLING (المورثة *PsMetI* عند نبات البازلاء *Pisum sativum*). يظهر الشكل مقارنةً بين التغيرات (الطفرات النقطية) المتوقعة أو المتنبئ بها بوساطة استخدام برنامج CODDLE وبين تلك التي تم الحصول عليها فعلياً عند الجماعة المدروسة وضمن المورثة الهدف. (a) يمثل المنحني الذي تم الحصول نتيجة تطبيق برنامج CODDLE على التتابع النكليوتيدي للمورثة *PsMetI*. تم تمثيل الاكسونات exons (مناطق التشفير التي تشارك في النسخ والترجمة) على شكل صناديق مغلقة ▭ في حين مثلت الانترونات على شكل خطوط —— . لقد تم استخدام برنامج CODDLE هنا لتحديد المناطق التي كان من المحتمل ظهور طفرات تبدل فيها (G:C إلى A:T) وذات تأثير ضار بتغييرها في طبيعة البروتين المترجم (طفرات misssence أو طفرات إيقاف Nonsense). من أجل المورثة *PsMetI* واعتماداً على تطبيق برنامج CODDLE تم اختيار ثلاثة مناطق (الخطوط ذات اللون الأزرق) لتتم عملية مسحها ضمن الجماعة المدروسة وللكشف عن الطفرات الناتجة أو المحدثة ضمن هذه المورثة. (b) يظهر الطفرات التي تم تحديدها فعلياً ضمن المورثة المذكورة، (Dalmais *et al., 2008*).

3. مواد وطرائق العمل

Material and Methods

تم تطبيق العمل في هذا البحث على جماعة نباتية من الشعير المزروع *Horduem vulgare* من الصنف الأوربي Lux. تم تطفير هذه الجماعة في العام 2003 في الدنمارك في مخابر RISØ الوطنية، وباستخدام مادة مطفرة قياسية Standard هي مادة أزيد الصوديوم sodium azide والتي تسبب طفرات نقطية عشوائية موزعة على كامل المجموع الوراثي، يمكن تقسيم تسلسل العمل في هذه الدراسة حسب الخطوات التالية:

1. المادة النباتية (الصنف Lux)
2. تطفير بذور جماعة الشعير Lux باستخدام أزيد الصوديوم
3. زراعة البذور المطفرة M_2 للحصول على أوراق نباتية بهدف استخلاص الـDNA
4. جمع العينات الورقية وتجفيفها
5. عزل المادة الوراثية (DNA) من الأوراق
6. عزل أنزيم القص Cel I من نبات الكرفس وتنقيته
7. تحديد التتابع النيكلوتيدي للمورثة *Dhn8* عند DNA الصنف Lux وعدد من المدخلات السورية بهدف الحصول على عينتي DNA تختلفان عن بعضمها البعض بشفع نكليوتيدي واحد لاستخدامهما كـPositive control من أجل:

أ. اختبار نسبة مزج عينات الـDNA المستخلصة بهدف استخدامها لاحقاً في خطوات تقانة الـTILLING مع المورثات الهدف

ب. اختبار تركيز أنزيم القص Cel I اللازم لكشف مناطق عدم التطابق ضمن قطع الـDNA المضخمة الخاصة بالمورثة/المورثات الهدف المدروسة

ت. اختبار قابلية كشف مناطق تشكل العرى (عدم التطابق) على جهاز رحلان ABI Prism™ 377 DNA Sequencer، (ملحق 4).

8. اختبار نسبة التطفير عند جماعة الشعير المدروسة بتطبيق خطوات تقانة الـــTILLING على مورثتي ديهيدرين (*Dhn12* و *Dhn13*)

أ. تضخيم مورثات الديهيدرين باستخدام تفاعل الـــPCR

ب. هضم قطع الـــDNA الناتجة عن التضخيم باستخدام أنزيم التقطيع Cel I

ت. ترحيل العينات ضمن هلامة بولي أكريلاميد وبوساطة رحلان كهربائي (جهاز ABI Prism™ 377 DNA Sequencer)

ث. تحديد التتابع النكليوتيدي للعينات التي تحتوي على الطفرات المكتشفة ضمن المورثات المدروسة.

ج. تحديد عدد الطفرات الناتجة عند كل من المورثتين وحساب متوسط تكرار الطفرات ضمن الجماعة

ح. التنبؤ بالتغيرات المتوقعة في البروتين الناتج عن التبدل في الحموض الأمينية نتيجة الطفرات المكتشفة.

1.3. تطفير جماعة الشعير Lux وعزل الـDNA

1.1.3. المادة النباتية

Plant Material



استخدم في هـذه الدراسة صنف الشعير Lux، وهو من الشعير المزروع *Hordeum vulgare* ثنائي الصف، وهو صنف أوربي يزرع بشكل رئيسي في الدنمارك وأيرلندة، وهو شعير ربيعي ذو إنتاجية عالية من الغلة، كما أنه يتميز بساق أو قشة قصيرة جداً وذو مقاومة معتدلة للضجعان، ومقاوم جيد للعفن الفطري mildew (*Blumeria graminis*)، وذو مقاومة عالية للصدأ الأسمر brown rust وهو معتدل المقاومة للتبقع net blotch، ولكنه حساس للـ*Rhynchosporium*. كما يتميز هذا الصنف بتاريخ نضوج متأخر وبصغر حجم الحبة.

2.1.3. تطفير بذور الشعير باستخدام مادة أزيد الصوديوم

Barley Mutagenesis by sodium azide

تم الحصول على جماعة الشعير Lux (9575 عينة) من الدنمارك، إذ تم تطفير جماعة الشعير Lux في المركز الوطني للبحوث العلمية في الدنمارك (RISØ)، وكانت البذور قد تمت معاملتها وفق ما يلي:

نقعت البذور (20000 ألف بذرة/حبة) مدة يوم كامل في الماء، ثم تمت معاملتها بـــ1.5 ميلي مولار من مادة أزيد الصوديوم المطفرة في محلول واقي من فوسفات الصوديوم
(1.5 millimolar sodium azide in 0.1 molar sodium phosphate buffer) وذو درجة حموضة pH 3، لمدة ساعتين ونصف وذلك وفقاً لبروتوكول الهيئة الدولية للطاقة الذرية IAEA (International Atomic Energy Agency) في تربية الطفرات (The IAEA manual on mutation breeding, 2^{nd} Ed.)، (Anonymous, 1977). بعد عملية المعاملة بالمادة المطفرة، تم غسل البذور تحت ماء صنبور جاري، ثم وضعت على ورق نشاف وجففت في الهواء لمدة يومين. بعد ذلك، زرعت البذور (بذور الجيل الطافر الأول M_1) في الحقل في نفس اليوم. حصدت 4 -6 سنابل لكل نبات M_1 ناتج عن زراعة تلك البذور، نميت بعدها بذور الجيل الطافـــر الثاني M_2 للحصول على نباتات الجيل M_2 ثم M_3 (زرعت بذرة واحدة من الجيل المطفر الأول M_1 لكل نبات). كما تم تسجيل بعض الأنماط الظاهرية غير الطبيعية الناتجة عن عملية التطفير وذلك في مرحلة النمو الخضري للنباتات (بعد أسبوعين من إنتاش البذور).

3.1.3. زراعة البذور المطفرة M_3 للحصول على أوراق نباتية بهدف استخلاص الــDNA

M_3 Seed germination for DNA isolation

لتطبيق تقانة الــTILLING تمت زراعة البذور M_3 الناتجة عن نباتات الجيل المطفر الثاني للحصول على أوراق نباتية بهدف استخلاص المادة الوراثية DNA. وقد تمت عملية زراعة البذور بشكل مباشر في تربة تحتوي على خلطة زراعية مؤلفة من (3 تراب/1مواد عضوية "تورب")/1 رمل ضمن حفر محضرة خصيصاً لهذا الغرض وبقياس 7 × 7 × 3 سنتيمتر (طول × عرض × ارتفاع) وبمعدل بذرتين لكل عينة من الجماعــة المؤلفة من 9575 عينة في الدفيئة، (شكل 12)، ولتسهيل العمل وتوفير الوقت اللازم للتعامل مع العدد الكبير لأفراد الجماعة المدروسة، تم تقسيم الجماعة المزروعة إلى خمسة مجموعات تألفت كل واحدة من حوالي 2000 بذرة وضمن ظروف زراعة:

- درجة حرارة: 10 -12°س ليلاً ، 18 -20°س نهاراً
- الإضاءة: 16 ساعة إضاءة – 8 ساعات ظلام





شكل 12: طريقة زراعة العينات في الدفيئة الزجاجية، (a) تظهر مجموعة كاملة (حوالي 2000 X 2 نبتة) مزروعة ضمن مساحة لا تتجاوز الأربعة أمتار مربعة. (b) هذا وقد زرعت البذور ضمن مساحة 7 × 7 × 3 سنتيمتر (طول × عرض × ارتفاع) وبمعدل بذرتين لكل عينة.

4.1.3. جمع العينات الورقية وتجفيفها

تمت عملية جمع العينات من الأوراق من النباتات المزروعة بعد أسبوعين من زراعتها (أخذت الورقة الثانية من كل نبات بما يعادل 200 ميلي غرام تقريباً). علماً بأن عملية جمع العينات تمت بقص المادة النباتية ووضعها ضمن أنبوب سعة 2 ميلي ليتر (Eppendorf tube 2 ml) وحفظت مباشرةً بالآزوت السائل، تم بعد ذلك تجفيف العينات لمدة أربعة أيام وذلك بوضعها في مجفدة freeze-dryer.

5.1.3. استخلاص الـــDNA بطريقة CTAB

DNA extraction by CTAB method

تم استخلاص الـــDNA لكل عينة من عينات جماعة الشعير المطفرة من الأوراق النباتية وتبعاً لـــSaghai-Maroof *et al.*, 1984، هذا وقد تم إجراء مع بعض التعديلات عليها لكي تصبح ملائمة للعدد الضخم من العينات المستخلصة، وقد تم العمل وفق الخطوات التالية:



1. تم طحن ما يعادل 200 ميليغرام من الأوراق النباتية "المجففة في المجفدة" حتى الحصول على مسحوق ناعم في أنبوب صغير سعة 2 ميلي لتر (Eppendorf) وبوجود ثلاث كرات معدنية من معدن الستانلس ستيل قطرها 3 ميليمتر وباستخدام جهاز رجاج (Retsch Mixer Mill “Mixer Mill MM 200” F. Kurt Retsch, Haan, Germany) الموضح مع الرج لمدة دقيقتين وعند سرعة 30

هرتز (30 هزة في الثانية). أضيف لها 1 ميلي لتر من سائل الاستخلاص Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB Buffer) والمسخن إلى درجة حرارة 65° س، ثم مزجت جيداً.

2. حضنت العينات لمدة 60 دقيقة مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي عند 65° سلسيوس (س)، ثم نقل الأنبوب إلى الثلج ووضع فيه لمدة 5 -10 دقائق.

3. أضيف بعد ذلك 1 ميلي لتر من مزيج كلوروفورم/أيزواميل الكحول بنسبة 1:24 ثم مزج الخليط لمدة 15 دقيقة باستخدام هزاز آلي وعند درجة حرارة المخبر.

4. ثقل المزيج (عملية طرد مركزي) لمدة 30 دقيقة بسرعة 4000 دورة في الدقيقة (4000 rpm).

5. أخذت الطبقة العليا (المتشكلة عن عملية التثفيل، والتي تمثل الوسط المائي الذي يحتوي على الأحماض النووية) بوساطة ماصة ونقلت كل 96 عينة إلى طبق يحتوي على 96 حفرة سعة 2.2 ميلي ليتر deep 96-well plates (2.2 ml capacity per well, Eppendorf).

6. أضيف 6 ميكرو ليتر من أنزيم *RNaese* إلى كل أنبوب (حفرة) ضمن الطبق لهضم الــRNA، ثم حضن المزيج لمدة 30 دقيقة وعند 65° سلسيوس (س).

7. أضيف الكحول الأيزو بروبانولي Iso-propanol بمعدل 2/3 من حجم الوسط المائي (1.2 ميلي ليتر) ومزج بهدوء بقلب الطبق رأساً على عقب عدة مرات بعد أن تم وضع الغطاء الخاص به (تم في هذه المرحلة ترسيب الأحماض النووية على شكل كتلة خيطية هلامية أو بيضاء).

8. تــم غسيل الــDNA المترســب بوساطة 1.5 ميلي لتر من منظم الغسيل Washing buffer (كحــول ايتلي 76%) والبارد (المحفــوظ بــدرجة حرارة - 20° س) وترك لمدة 20 دقيقة في الثلج، ثم ثقل المزيج لمدة 10 دقائق بسرعة 10000 دورة/الدقيقة، وبدرجة حرارة 0° س.

9. استبعد سائل الغسيل وكررت مرحلة الغسيل بالايتانول.

10. استبعد سائل الغسيل وحفظ الـــDNA المتجمع في قعر الأنبوب وجففت العينات باستخدام التجفيف مع التفريغ الهوائي في مجففة vacuum dryer لمدة 10 -20 دقيقة.

11. أذيبت عينات الـــDNA في 100 ميكروليتر من المحلول المنظم TE، وذلك عن طريق تركها على هزاز آلي مدة 12 -24 ساعة وعند درجة حرارة 4°س.

12. تم اختبار جودة الـــDNA المستخلص بوساطة عملية رحلان كهربائي أفقي Electrophoresis وضمن هلامة آغاروز Agarose Gel بتركيز 1% آغاروز، كما تمت عملية تقدير جودة quality الـــDNA من خلال تمرير العينات المستخلصة الحاوية على الـــDNA ضمن هلامة آغاروز وباستخدام رحلان كهربائي (عادةً ما تستخدم هلامة بتركيز 1% آغاروز لتقدير جودة الـــDNA، كما يقدر تركيز عينات الـــDNA المستخلصة من خلال مقارنتها على الهلامة وبشكل تقريبي مع عينات قياسية شاهدة معروفة الكمية توضع على أطراف العينات المدروسة ضمن الهلامة)، (Sambrook et al., 1989)

2.3. خطوات تقانة الــTILLING المستخدمة لتحديد الطفرات النقطية

TILLING procedure to detect induced point mutations

1.2.3. عزل أنزيم القص Cel I من نبات الكرفس وتنقيته

Isolation and Purification of Cel I enzyme from celery



1.1.2.3. عــزل أنزيـــم القص Cel I من نبات الكرفس

تم عزل وتنقية أنـــزيم القص Cel I اعتمـــاداً على طـــريقة Oleykowski, et al. 1998 مع إدخال بعـــض التعديـــلات عليهـــا وباستخـــدام طـــريقـــة الكروماتوغرافيا (ÄKTAexplorer 10S chromatography system) ووفق أربعة مراحل (تم العمل في جميع المراحل عند 4° سلسيوس (س)):

المــرحلة الأولـــى: تم عملية عصر ومزج 6.3 كيلو غرام من أوراق نبات الكرفس *Apium graveolens* celery L. (وهو نبـــات مـــن فصيلـــة الخيميـــات *Apiaceae*) في خلاط، ثم تم إضافة المحلول الواقي A (Buffer A)

للمزيج (يحتوي المحلول A على 0.1 مولار 0.1M من محلول الـــTris وعند درجة حموضة pH 7.7، كما يحتوي على 0.1 ميلي مولار 0.1mM من مادة PMSF (phenylmethylsulfonyl fluorideأو phenylmethanesulfonyl fluoride). تمت بعدها تصفية المعلق (المزيج) الناتج من خلال شبكة نايلون nylon mesh وباستخدام التثفيل لمدة 30 دقيقة وبسرعة 10000 دورة بالدقيقة. أخذ السائل الطافي وأضيف له كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ حتى أصبح تركيزه 25% من درجة التشبع. بعد ساعة، ثفل المعلق لمدة 60 دقيقة وعند سرعة 20000 دورة بالدقيقة. تم تعديل السائل الطافي بكبريتات الأمونيوم حتى درجة تشبع 80% مع التحريك لمدة 60 دقيقة، ثم ثفل ثانيةً لمدة 60 دقيقة وعند سرعة 20000 دورة بالدقيقة. طرح السائل الطافي وتم حل الكتلة المترسبة (pellet) في 400 مل من المحلول الواقي B (وهو عبارة عن محلول A يحتوي على 0.5 مولار من كلوريد الكالسيوم) وضمن أنبوب ذو غشاء حلولي dialyze (غشاء فرز).

المرحلة الثانية: تمت معايرة المركب Con A Sepharose 4B (60 ميلي ليتر) باستخدام المحلول B. تم تحريك المستخلص لمدة ساعتين مع إضافة 50 مل من محلول Con A ثم نقل إلى عمود فصل ذو قطر 2.6 سم يحتوي على 10 مل من محلول Con A، تم غسل المعلق الناتج بـــ600 مل من المحلول B قبل أن يتم نقله إلى وعاء آخر حيث تم حل الأنزيم الناتج (Cel I) في 250 مل من المحلول الواقي C (وهو عبارة عن محلول B يحتوي على 0.01% من Triton X-100 و0.3 ميلي مولار من methyl-α-D-mannopyranoside) عند معدل جريان (تدفق) 3 ميلي ليتر/دقيقة. تم غسيل البروتين الناتج (eluted) ضمـــن غشاء حلولي dialyzed محاط بمحلول واقي D (50 ميلي مولار من مادة Tris ذو درجة حموضة pH 8.0 يحتوي على 5 ميلي مولار من methyl-α-D-mannopyranoside و0.01% مـــن Triton X-100 و25 ميكرو مولار من PMSF)

المرحلـــة الثالثة: تم تحميل المستخلص الأنزيمي الناتج على عمود Hiprep 16/10 Q XL معاير (موازن) بوساطة محلول واقي D. ثم تم غسيل عمود الفصل في 400 ميلي ليتر من محلول واقي D وفــق تراكيـــز ذات تـــدرج خطي (0-100%) في 400 ميلي ليتر من محلول واقي E (محلول واقي D يحتوي على 0.5 مولار من مادة كلوريد الكالسيوم KCl)، وقد تم تطبيقه عند معدل تدفق 5 مل/دقيقة. تمت تجزئة المعلق الناتج إلى أحجام متساوية (4 مل لكل منها) ثم اختبارها ومعايرة مدى فعالية الأنزيم المستخلص (Cel I enzyme). تلك الكميات المعلقة التي أظهرت فعالية أكبر من الأنزيم تم مزجها وغسلها ثانية ضمن غشاء حلولي dialyzed محاط بمحلول واقي D.

المرحلة الرابعة: تم تحميل المعلق على عمود فصل Mono Q (1 مل) معاير (موازن) بوساطة محلول واقي D. غسل بعدها عمود الفصل في 20 مل من محلول واقي D وفق تراكيز ذات تدرج خطي (0-100%) في 50 مل من محلول واقي E وعند معدل تدفق 1 مل/دقيقة. تمت تجزئة المعلق الناتج إلى أحجام متساوية (1 مل لكل منها)، ثم تم استخدام خطوات pUC18 RF-I nicking assay كما هو موصوف من قبل Yang وزملائه (Yang et al. 2000)، وذلك لتحديد تركيز أنزيم Cel I بعد عملية التنقية.

2.1.2.3. تحديد فعالية أنزيم Cel I بعد عملية التنقية

Cel I enzyme activity

تم تحديد فعالية وتركيز الأنزيم المستخلص وفق ما يلي:

استخدم 0.5 ميكرو غرام من البلاسميد pUC18 (2686 شفع نكليوتيدي) وحضن مع كميات مختلفة من أنزيم Cel I المستخلص لمدة 60 دقيقة وعند درجة حرارة 45° سلسيوس (س) ضمن حجم 30 ميكروليتر من المحلول الواقي H (يحتوي على 20 ميلي مولار من آسيتات الصوديوم وعند درجة حموضة pH 5.5، كما يحتوي على

10 ميلي مولار من كلوريد البوتاسيوم). يمكن استخدام المحلول الواقي I (يحتوي على 20 ميلي مولار من HEPES عند درجة حموضة pH 7.5 و10 ميلي مولار من كلوريد البوتاسيوم و2 ميلي مولار من كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$) عوضاً عن المحلول H، وذلك بوجود وغياب شوراد المغنيزيوم (عادةً ما يستخدم كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$ كمصدر لشوراد المغنيزيوم). أوقف بعد ذلك التفاعل بإضافة 5 ميكروليتر من محلول الإيقاف (يحتوي على 50 ميلي مولار من Tris-HCl عند درجة حموضة pH 6.8 و3% من SDS و4.5% من β-mercaptoethanol و30% غلسيرين و0.001 من مادة أزرق البروموفينـــول). تم بعد ذلك تحميل 10 ميكروليتر من المزيج السابق مضافاً له 4 ميكروليتر من محلول التحميل Loading buffer على هلامة آغاروز وبتركيز 0.8%. بعد إجراء عملية الرحلان الكهربائي والصبغ بمادة بروميد الايثيديوم تم أخذ صورة للهلامة، واستخدمت الصورة السلبية negative picture وبوساطة الاستعانة ببرنامج حاسوبي (IS-1000 Digital Imaging System, Alpha Innotech Corp.) لحساب تركيز الأنزيم.

3.1.2.3. اختبار تراكيز مختلفة من أنزيم Cel I

Test of different concentration of Cel I

لتحديد التركيز الأمثل من أنزيم القص Cel I المحضر من نبات الكرفس المستخلص في عملية قص مناطق تشكل العرى أو عدم المطابقة للمورثات الهدف المدروسة أو المراد دراستها ضمن جماعة الشعير Lux، تم اختبار 8 تراكيز (كميات) مختلفة من هذا الأنزيم، (0.01، 0.02، 0.04، 0.1، 0.2، 0.5، 1، 2 ميكرو ليتر من الأنزيم الممدد 300/1). تم هذا الاختبار على عينتي DNA إيجابيتين مضخمتين باستعمال البادئات الخاصة بمورثة الديهيدرين *Dhn8* (كما هو موصوف في الفقرة 2.2.3.).

2.2.3. تحديد التتابع النيكلوتيدي للمورثة *Dhn8* عند الصنف Lux وثلاثة مدخلات شعير سورية

DNA sequencing of *Dhn8* of Lux and three Syrian barley landraces

قبل اختبار نسبة المزج المناسبة لعينات الـــDNA وكذلك تركيز أنزيم القص Cel I اللازم لعملية القطع ضمن خطوات تقانة الـــTILLING من أجل استخدامها مع جميع أفراد جماعة الشعير المدروسة كان لا بد أولاً من الحصول على قطعتي DNA يكون فيهما التتابع النيكلوتيدي متماثل مع وجود اختلاف في واحد من النكليوتيدات على الأقل بهدف تطبيق خطوات تقانة الكشف عن التباينات الايجابية (استخدام عينتين باعتبارهما كـــpositive control)، ولهذا الغرض تمت عملية تحديد التتابع النكليوتيدي للمورثة *Dhn8* وذلك عند كل من الصنف Lux بالإضافة لثلاثة مدخلات من الشعير السورية (HSLT256 وHSLT225 وٍHSLT143) تم الحصول عليها من البنك المورثي للبذور في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة ايكاردا (ICARDA-GenBank).

1.2.2.3. عزل المادة الوراثية DNA:

DNA isolation

تم عـــزل المادة الوراثية DNA من الأوراق الفتية للمدخلات الثلاثة (بعد زراعة البذور بثمانية أيام)، وذلك عن طريق تجفيفها بوساطة المجفدة لمدة ثلاثة أيام، ثم طحنها في أنابيب صغيرة وباستخدام 3 كرات معدنية صغيرة (جهاز Retsch، Retch mixer mill MM3). استخلصت المادة الوراثية DNA اعتماداً على طريقة CTAB (كما هو موصوف في الفقرة 5.1.3.).

2.2.2.3. تضخيم المورثة *Dhn8* باستخدام تفاعل الـــPCR

PCR amplification of *Dhn08* gene

تم في هذا البحث استخدام البادئات الخاصة بتضخيم مورثة الديهيدرين *Dhn8* (البادئة الأمامية 5’-GCGGCTATATAAGGACGAGTCA-3’ والبادئة العكسية 5’-CGACACACGCCAACAATTTA-3’)، يصل طول القطعة المضخمة بوساطة هاتين البادئتين إلى 1065 شفعاً نكليوتيدياً، تألف مزيج التفاعل من بادئة أمامية وكذلك بادئة عكسية، وبتركيز نهائي 0.5 ميكرو مولار في الحجم المستخدم من أجل تفاعل الـــPCR. تم انجاز تفاعل الـــPCR في حجم 20 ميكروليتر يحتوي على 50 نانو غرام من DNA المستخلصة، وهي أربعة عينات DNA، عينة DNA تابعة للصنف Lux غير المعامل بالمادة المطفرة و ثلاثة عينات من مدخلات الشعير السورية.

3.2.2.3. تحديد التتابع النكليوتيدي (تفاعل الـــPCR)

PCR-Sequencing reaction

تعتمد تقانة تحديد التتابعات النكليوتيدية (DNA sequencing) على استخدام تفاعل الـــPCR وبوساطة استخدام بادئات مختصة بتضخيم المنطقة أو المورثة الهدف مع استخدام نكليوتيدات غير معلمة وأخرى معلمة بمادة مفلورة (تعلّم النكليوتيدات بأربعة ألوان فلورة مختلفة، بلون أحمر للتيامين، وأزرق للسيتوزين، أصفر للغوانين، وأخضر للأدنين)، ثم تفصل القطع الناتجة عـــن تفاعل الـــPCR علـــى جهاز رحلان كهربائي، (استخدم هنا جهاز ABI PrismTM 377 DNA Sequencer)، وبالاستعانة بأشعة ليزر مع كاميرا ضمن جهاز الرحلان لالتقاط الفلورة وتحديد التتابع النكليوتيدي .

حُضّر مزيج التفاعل السلسلي البوليميرازي (تفاعل الـــPCR) تبعـــاً لـــ(Choi et al., 1999) ووفق ما يلي:

أجري التفاعل في حجم نهائي قدره 10 ميكروليتر لكل عينة يحتوي على:

- 4 ميكرو ليتراً ماء
- 1 ميكروليتر من الـــDNA (30 -100 نانو غرام) (الـــDNA التضخيم باستخدام البادئات المذكورة سابقاً)
- 1 ميكروليتر (0.5 ميكرومول) من إحدى البادئتين الأمامية أو العكسية (أجري التفاعل لكل قطعة DNA/مورثة *Dhn8* بشكل منفصل، مرةً مع البادئة الأمامية والأخرى باستخدام البادئة العكسية)
- 4 ميكروليتراً من مزيج Primex

(1X premix including *Taq* polymerase, dNTPs, BigDye-dNTPs)
(API Prism, PE Applied Biosystem) ،(Big Dye Terminator Kit)

تم إجراء التفاعل للبادئة الأمامية والعكسية بشكل منفصل، وقد تم التفاعل باستخدام جهاز التدوير الحراري، كما استخدم البرنامج الحراري التالي في التفاعل السلسلي البوليميرازي PCR:

- 35 دورة تتألف كل منها من:

1. 20 ثانية لفصل سلسلتي الـــDNA وعند درجة حرارة 96° س.
2. 20 ثانيـــة لارتباط البادئـــة مع الـــDNA القالب وفي درجة حرارة 50° س.
3. 4 دقائق لتركيب السلسلة الجديدة وعند درجة حرارة 60° س.

ثم فحصت العينات الناتجة بتمريرها على هلامة البولي أكريلاميد 5% وباستخدام جهاز ABI Prism™ 377 DNA Sequencer.

أجري تحليل النتائج عن طريق تحليل ملف الهلامة الناتج عن عملية الرحلان الكهربائي والمسمى ملف الهلامة (Gel File) بوساطة برنامج DNA Sequencing Analysis Software Version 3.2، وفيه تمت عملية تحويل الملف الخاص بالهلامة إلى ملفات مفردة خاصة بكل عينة من العينات التي تم تحميلها على جهاز الـABI.

حللت الملفات الخاصة بالعينات المدروسة بعدها باستخدام برنامج تحليلي آخر SEQUENCHERTM Version 3.2، إذ تمت مقارنة التتابعات النكليوتيدية لعينات DNA الطرز أو المدخلات المدروسة في هذه التقانة والخاصة بالموقع المورثي للمورثة *Dhn8*.

3.2.3. تحديد تركيز الـDNA ونسبة التمديد الأمثل من أجل تضخيم المورثة/المورثات الهدف باستخدام الـPCR

DNA concentration and dilution ratio for PCR amplification of target gene/genes

تم اختبار نسبة التمديد على عينتي DNA تختلفان عن بعضهما بشفع نكليوتيدي الأولى هي عينة DNA مستخلصة من الشعير Lux غير المعامل والثانية هي عينة DNA مستخلصة من أحد مدخلات الشعير السورية (كما هو موصوف في الفقرة 2.2.4.) وكلتا العينتين معروفتي التتابع النكليوتيدي بالنسبة لمورثة الديهيدرين *Dhn8*، تم اختبار تراكيز (نسب تمديد) مختلفة، إذ اختبرت تراكيز 0.125 و0.25 و0.5 و1 و2 نانوغرام من الـDNA، وهي معادلة لتمديدات H2O:DNA، 4000:1، 2000:1، 1000:1، 500:1، 250:1، وعلى اعتبار أن تراكيز الـDNA

لعينات الجماعة المدروسة كان مقارباً لـــ500 نانوغرام/ميكروليتر) مع مورثة الديهيدرين *Dhn8*.

4.2.3. اختبار نسبة مزج عينات الـــDNA

DNA pooling ratio test

تم اختبار نسبة المزج المراد دراستها على عينتي DNA، الأولى من الصنف Lux (وهو نفس صنف الشعير المزروع Lux)، أما الثانية فقد استخلصت من أحد مدخلات الشعير السورية (كما هو موصوف في الفقرة 2.2.3.) وبعد أن تم تحديد تباين نكليوتيدي نقطي بين DNA العينتين عند المورثة *Dhn8*.

1.4.2.3. تضخيم المورثة *Dhn8* باستخدام تفاعل PCR

PCR amplification of *Dhn08* gene

تم في هذا البحث استخدام البادئات الخاصة بتضخيم مورثة الديهيدرين *Dhn8* (البادئـــة الأماميـــة 5’-GCGGCTATATAAGGACGAGTCA-3’ والبادئة العكسية 5’-CGACACACGCCAACAATTTA-3’)، وهي تختلف عن تفاعل الـــPCR العادي (الموصوف في الفقرة 2.2.2.3.) بأنه يتم استخدام نوعين من البادئات لقطعة الـــDNA أو المورثة الهدف المراد كشف التباينات النكليوتيدية ضمنها (إن وجدت)، فالبادئات هنا نوعين (بادئات غير مفلورة وبادئات معلمة بمادة مفلـــورة (contained 5’-labeled VIC-dye (green) and 5’-labeled 6-FAM dye (blue)) يصل طول القطعة المضخمة بوساطة هاتين البادئتين إلى 1065 شفعاً نكليوتيدياً، يختلـــف التتابع النكليوتيدي للقطعة المضخمة من DNA التابع لصنفي الشعير المدروسين بشفع نكليوتيدي واحد SNP (Single Nucleotide polymorphism)، على اعتبار أن سلسلة DNA مزدوجة. تألف مزيج التفاعل من أربعة بادئات، بادئة أمامية (معلمة بالفلورة وغير معلمة) وكذلك بادئة عكسية معلمة وغير معلمة وبنسبة

2:3 (غير معلمة: معلمة) لكلا البادئتين، وبتركيز نهائي 0.5 ميكرومولار في الحجم المستخدم من أجل تفاعل الــPCR. تم انجاز تفاعل الــPCR في حجم 20 ميكروليتر يحتوي على 50 نانوغرام من DNA المستخلصة.

تم استخدام 50 نانو غرام في تفاعل PCR، كما تم تجريب نسب مزج مختلفة من عينتي الــDNA المدروستين في هذا البحث، فقد تم تجريب كلٍ من النسب 1:1، و1:4، و1:8، و1:10 وأخيراً 1:12. فعلى سبيل المثال في حال المزج 1:1 تم استخدام 25 نانوغرام من كل عينة DNA في حين تم استخدام 10 نانوغرام من عينة DNA الأولى و40 نانوغرام من العينة الثانية في حالة نسبة المزج 1:4، وهكذا بالنسبة لبقية النسب المدروسة.

2.4.2.3. مرحلة الهضم الأنزيمي بوساطة Cel I

Cel I Digestion

تمت عملية الهضم تبعاً لــ (Caldwell et al, 2004) ووفق الآتي:

من أجل هضم قطع DNA الناتجة عن عملية التضخيم ضمن حجم 10 ميكروليتر من التفاعل السابق، تم تحضير محلول يحتوي على HEPES (10 mM) وعنــد درجــة حموضــة pH 7.5، وكبــريتات المغنيــزيوم (10 mM)، و0.002% (وزن/حجم) Triton X-100، و0.2 ميكروغرام/ميلي ليتر من BSA (bovine serum albumin)، و300/1 تمديد من أنزيم الهضم Cel I. تم بعدها تحضين المزيج المضاف إلى 10 ميكروليتر من ناتج تفاعل التضخيم PCR عند درجة حرارة 45°س لمدة ساعة (وهي درجة الحرارة اللازمة لعمل أنزيم الهضم Cel I). تم إيقاف التفاعل بعدها بإضافة 5 ميكروليتر من محلول EDTA (0.2 M) وعند درجة حموضة pH 8.

لزيادة تركيز العينات (منتجات PCR المضخمة) ولإنقاص حجم المزيج الناتج قبل تحميله على جهاز الرحلان الكهربائي تم تحضين العينات عند درجة حرارة 85° س لمدة 45 دقيقة وتركها بدون تغطية (من أجل تبخير الماء الزائد) ثم خزنت عند درجة حرارة 4° س إلى حين تحميلها على جهاز الرحلان.

3.4.2.3. كشف قطع الـــDNA على جهاز الرحلان الكهربائي

DNA detection on electrophoresis

تـــم تحميل العينات الناتجة عـــن عملية القص علـــى جهاز رحلان كهربائي ABI PRISM 377 DNA Sequencer وضمن هلامة فصل بطول 12سم سنتيمترا وبتركيز 5% من مادة البولي أكريلاميد (كما هو موصوف في الفقرة 5.2.3.).

5.2.3. اختبار قابلية كشف قطع القص (مناطق تشكل العرى أو عدم التطابق) على جهاز رحلان ABI PRISM 377 DNA Sequencer

Heterdoplex analysis detection using ABI PRISM 377 DNA Sequencer

تم تمرير العينات المختبرة في الفقرة (4.2.3.) ضمن هلامة البولي أكريلاميد 5% وباستخدام جهاز ABI Prism™ 377 DNA Sequencer. يعتمد مبدأ تحديد عينات الـــDNA المضخمة ضمن تفاعل الـــPCR في هذا الجهاز على البادئات المستخدمة في التفاعل والتي تحتوي على جزيئة مفلورة يمكن التقاط فلورتها وتحديدها ضمن الجهاز بوساطة أشعة الليزر وكاميرا.

6.2.3. اختبار نسبة التطفير بكشف الطفرات النقطية لدى جماعة الشعير المطفرة Lux وضمن مورثتي ديهيدرين (*Dhn12* و*Dhn13*)

Check of the mutation ratio of Lux mutated population at two *Dhn* loci (*Dhn12*, *Dhn13*)

تم اختبار نسبة التطفير عند جماعة الشعير Lux بغربلة الجماعة مع مورثتي ديهيدرين، *Dhn12* و*Dhn13*، وقد تم العمل وفق:

1.6.2.3. تضخيم مورثات الديهيدرين بوساطة التفاعل PCR

PCR reaction of *Dhn* genes

تم استخدام برنامج CODDLE لتصميم بادئات الديهيدرين وبالاستعانة بمعلـــومات المواقع المـــورثية الديهيدرينية عنـــد الشعير (Choi et al., 1999 وChoi et al., 2000)، للتعرف على المواقع المورثية للـــDNA المسؤولة عن إنتاج بروتينات الديهيدرينات في الطرز الوراثية المستخدمة في هذه الدراسة، استخدمت البادئات الموضحة في الجدول (1) لتضخيم الـــDNA، وذلك بوساطة التفاعل السلسلي البوليميرازي PCR وباستخدام جهاز التدوير الحراري Thermal cycles Machine (PCR)، وقد أجري تفاعل (PCR) وحضر المزيج الخاص به (20 ميكروليتير) بشكل منفصل لكل مورثة على حدة ومع كل بادئة (الأمامية والعكسية) من البادئات الديهيدرينية، إذ أنه تم تحضير مزيج وبرنامج تدوير حراري خاص بهذا التفاعل، وقد حضر المزيج وفق ما ذكر سابقاً، مع العلم أنه تم استخدام عينات مع نسبة مزج 10:1 مع كامل الجماعة المدروسة.

جدول (1): التتابع النكليوتيدي لبادئات مورثتي الديهيدرين *Dhn12* و*Dhn13* المستخدمة في مرحلة الكشف عن التباينات النكليوتيدية (الطفرات النقطية) ضمن تقانة الـــTILLING:

التتابع النيكلوتيدي للبادئة		نوع الفلورة المستخدمة	درجة حرارة الارتباط	حجم القطعة المضخمة bp
Dhn12F	5'-GTGCAGCGCTACAAACAGAA-3'	5'-Fluorescent label, VIC	58 -68° س	745
Dhn12R	5'-GATCGCGGGCATCTTATTTA-3'	5'-Fluorescent label, 6-FAM		
Dhn13F	5'-TAAATACCGGCGAAGACGAG-3'	5'-Fluorescent label, VIC	58 -68° س	544
Dhn13R	5'-CCAACAAGAAGCCAAGAACG-3'	5'-Fluorescent label, 6-FAM		

أجري تفاعل الـPCR ضمن حجم 20 ميكروليتر من المزيج باستخدام جهاز التدوير الحراري، وقد أستخدم البرنامج الحراري التالي في التفاعل السلسلي البوليميرازي PCR:

- دورة واحدة لفصل سلسلتي الـDNA لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 95° س.
- 10 دورات تتألف كل منها من:

1. 30 ثانية لفصل سلسلتي الـDNA عند درجة حرارة 95° س.
2. 30 ثانية لارتباط البادئة مع الـDNA القالب عند درجة حرارة 68° س (تنقص درجة الحرارة بمعدل درجة واحدة كل دورة لتصل في نهاية هذه المرحلة (10 دورات) إلى 59° س.
3. 1 دقيقة لتركيب السلسلة الجديدة وعند درجة حرارة 72° س.

- 45 دورة تتألف كل منها من:

1. 30 ثانية لفصل سلسلتي الـDNA عند درجة حرارة 95° س.
2. 30 ثانية لارتباط البادئة مع الـDNA القالب عند درجة حرارة 58° س.
3. دقيقة لتركيب السلسلة الجديدة وعند درجة حرارة 72° س.

- دورة واحدة لمدة 5 دقائق وعند درجة حرارة 72° س.

- دورة واحدة لفصل سلاسل الــDNA للقطع المضخمة لمدة 10 دقائق وعند درجة حرارة 99° س.
- 70 دورة لمدة 30 ثانية لكل دورة وفيها تنقص درجة الحرارة 0.3° س في كل دورة لتصل إلى 49° س في آخر دورة. إن الهدف من هذه المرحلة هي السماح لسلاسل الــDNA المنفصلة بالعودة للالتحام مع بعضها. تعاود كل سلسلة الالتحام مع السلسلة المتممة لها، مما يعطي فرصة التحام السلاسل المتممة بشكل عشوائي. فإذا كانت قطع الــDNA المضخمة تلك الآتية من أحد العينات العشرة الممزوجة تحتوي على طفرة نقطية في التسلسل النيكلوتيدي لها، فإنه من المحتمل أن تعاود الارتباط مع سلسلة متمة لها ولكن غير حاوية على هذه الطفرة، مما يسمح بتشكيل عروة ومنطقة عدم تطابق.

2.6.2.3. هضم العينات الناتجة عن استخدام الــPCR بوساطة أنزيم Cel I
Digestion of PCR product by Cel I enzyme

تم تطبيق تقانة القطع (القص، الهضم) اعتماداً على Colbert et al 2001، ووفق ما يلي:

تم هضم 10 ميكروليتر من منتجات التضخيم (PCR products) في أطباق خاصة (PCR plates) تحتوي على 96 حفرة بوساطة إضافة 20 ميكروليتير من محلول واقي (يحتوي على 10 ميلي مول من HEPES ذو درجة حموضة pH 7.5 و10 ميلي مول من كبريتات المغنيزيوم و0.002 وزن/حجم من Triton X-100 و0.2 ميكروغرام/ميلي ليتر من bovine serum albumin وأنزيم Cel I بنسبة تمديد نهائي 1/300.

تم حضن مزيج العينات مع المحلول الواقي عند درجة حرارة 45° س ولمدة 60 دقيقة، ثم تم إيقاف التفاعل بإضافة 5 ميكروليتر من محلول 0.2 M EDTA (pH 8.0). تم بعدها تنقية المزيج باستخدام عمود فصل من مسحوق Sephadex G-50، (شكل 13)

(Millipore multiscreen system 96 well filtration plate containing Sephadex G-50 fine, Amersham Biosciences)



شكل 13: يمثل مبدأ تنقية عينات الــPCR ضمن عمود فصل column من مسحوق Sephadex G-50، وفيها تتم عملية التنقية باستبعاد جزئيات البادئات (المعلمة بالفلورة وغير المعلمة) وكذلك النكليوتيدات غير المشاركة في تفاعل الــPCR.

أضيف بعد ذلك للمزيج الناتج عن عملية التنقية 5 ميكروليتر من الفورماميد formamide يحتوي على مؤشر جزيئي (Rox-1000 internal lane standard) يحتوي على 200 ميكروغرام/ميلي ليتر من أزرق البروموفينول و16/1 تمديد من Rox-1000 (Applied Biosystem).

تم إنقاص حجم المزيج السابق الكلي إلى 5 ميكروليتر بحضن العينات عند درجة حرارة 85º س ولمدة 45 دقيقة ثم تم تخزينها عند درجة 4º س لحين الاستعمال (الترحيل ضمن هلامة بولي أكريلاميد ضمن جهاز ABI-377).

3.6.2.3. تحميل قطع الـــDNA الناتجة عن عملية الهضم على هلامة بولي أكريلاميد لفصلها باستخدام رحلان كهربائي

Analysis of DNA fragment cut on polyacrylamide gel using electrophoresis

تم تحميل العينات على هلامة بولي أكريلاميد ذات تركيز 5% وطول 12 سم ومشط يحتوي على 96 حفرة، تم ترحيل العينات ضمن الهلامة باستخدام رحلان كهربائي وضمن جهاز ABI PRISM 377 DNA Sequencer. تم تحليل ملفات العينات الناتجة عن الرحلان باستخدام برنامج حاسوبي GeneScan 3.1 (Perkin Elmer).

كما تم تطبيق كلٍ من الخطوات التالية فيما بعد من أجل تحديد نوع الطفرات الناتجة عند كل من المورثتين *Dhn12* و*Dhn13*:

- تم تحديد التتابعات النكليوتيدية للقطع الـــDNA التي تحتوي على الطفرات المكتشفة بتضخيم القطع الخاصة بكل مورثة كما في الفقرة (2.2.2.3.) مع فارق وحيد هو استخدام البادئات الخاصة بمورثة الـــ*Dhn12* والـــ*Dhn13* عوضاً عن البدئات الخاصة بالمورثة *Dhn8*
- تم إجراء تفاعل الـــPCR الثاني لتحديد التتابعات النكليوتيدية وتحليل ملف الهلامة ومقارنة التتابع النكليوتيدي الناتج كما في الفقرة (3.2.2.3.)

7.2.3. تنبؤ التغيرات المتوقعة في الحموض الأمينية نتيجة الطفرات المكتشفة:

تم التنبؤ بالتبدلات أو التغيرات في الحموض الأمينية الناتجة عن الطفرات النقطية المكتشفة من خلال إدخال بيانات المورثتين المدروستين *Dhn12* و*Dhn13* ونوع ومواقع الطفرات المكتشفة ضمن برنامج SIFT

4. النتائج والمناقشة

Results and Discussion

1.4. تطفير جماعة الشعير Lux

1.1.4. تسجيل الأنماط الشكلية غير الطبيعية الناتجة عن معاملة جماعة الشعير Lux بمادة أزيد الصوديوم

Scoring of abnormal phenotype of Lux population that treated with sodium azide

تعمل المطفرات الكيميائية المستخدمة في تقانة الــTILLING على إحداث طفرات نقطية عشوائية على مستوى المجموع الوراثي ككل للكائن المطفر، تنعكس هذه الطفرات على شكل تبدلات في الحموض الأمينية (حسب نوع الطفرة أو الطفرات المحدثة) المكونة للبروتينات والمترجمة من الحمض النووي DNA، قد تعكس هذه التبدلات في الحموض الأمينية "وبالنتيجة البروتين المكونة له" صفات شكلية جديدة يمكن رؤيتها بالعين المجردة أو قد تكون تبدلات خفية لا تعكس بالضرورة تغيراً شكلياً وذلك حسب الصفات الشكلية للكائن المطفر وعلاقتها بالمورثة أو المورثات المسؤولة عن ظهورها. فكما هو معروف يمكن أن يكون مرد بعض الصفات (سواءً كانت شكلية أو فيزيولوجية أو غيرها) لأكثر من مورثة أو قد تكون ناتجة عن أكثر من تفاعل بين أكثر من صفة، كما تؤثر الطفرات في اختلاف الصفات حسب نوع الصفة إذا كانت سائدة أو متنحية أو غيرها من أنواع توريث الصفات.

أظهرت الدراسة التي أجريت على 2000 عينة من عينات نسل الجيل الأول M_1 عند جماعة الشعير Lux المدروسة في هذا البحث وجود 60 طفرة شكلية على الجذور (3%) تنوعت من نباتات لها شعيرات جذرية قصيرة (أقصر من تلك التي للنباتات الطبيعية غير المعاملة) أو شعيرات جذرية أقل كثافة إلى عدم وجود شعيرات على الإطلاق مقارنة مع الشعيرات الجذرية للنباتات غير المطفرة، (شكل 14). تعتبر هذه الطفرات شائعة أيضاً كما طفرات اليخضور في تحديد تكرارية الطفرات الناتجة عن المعاملة بالمواد الكيميائية "بشكل أولي أو مبدئي" وإعطاء مدلول عن نجاح عملية التطفير باستخدام المواد الكيميائية المطفرة.



شكل 14: يبين مقارنة بين جذور نباتين، الأول (إلى اليمين) من جماعة الشعير Lux المطفرة والمعاملة بمادة أزيد الصوديوم، حيث تظهر الصورة وجود طفرة في الشعيرات الجذرية أدت إلى قصر طول الشعيرات أو الأوبار الجذرية والثاني (إلى اليسار) يظهر جذور وأوبار جذرية لنبات طبيعي غير معامل. تم تحديد طفرات الجذور بعد ثلاثة إلى أربعة أيام من زراعة البذور ضمن تيار ماء جارٍ على ورق نشاف أسود black filter paper.

كما تم في هذه الدراسة تسجيل أربعة أشكال مختلفة من الأنماط الشكلية غير الطبيعية (التي تختلف عن النمط الطبيعي لنباتات نفس الصنف من الشعير ولكن غير المعامل بالمادة المطفرة) وذلك في مرحلة الثلاثة أسابيع بعد زراعة البذور الناتجة عن الجيل الثاني M_2 (نباتات الجيل الثالث M_3)، وهذه الأنماط هي:

- عدم إنبات (كانت البذور عقيمة وغير قادرة على النمو)
- نباتات متقزمة dwarf plants
- نباتات تحتوي على طفرات يخضورية (نباتات شاحبة، صفراء، بيضاء)
- نباتات تحتوي على تبقعات مختلفة necrotic spots

أظهرت نتائج التسجيل أن 3.37% (323 نبات من أصل 9575 نبات معامل) أعطت أنماطاً شكلية غير طبيعية (الأنماط الأربعة المذكورة) مقارنةً مع الشاهد (100 نبتة من النمط البري غير المعامل) وفق ما يلي:

- 60 حبة كانت عقيمة (لم تعط نمواً نباتياً) 0.63%.
- 61 نباتاً كانت بيضاء تماماً، و16 نباتاً ما بين شاحب وأصفر (0.8%)، (شكل 15، B وD)
- 153 نباتاً متقزماً 1.6%، (شكل 15، A)
- 49 نباتاً عليها تبقعات مختلفة على الأوراق necrotic spots 0.51%، (شكل 15، C)



شكل 15: يبين الأنماط الشكلية غير الطبيعية عند جماعة الشعير Lux المسجلة، (A) يظهر نباتات بيضاء ومتقزمة، (B) يظهر نباتات صفراء، (C) يظهر نباتاً يحتوي على تبقعات مختلفة necrotic spots على الأوراق، (D) يظهر نباتات بيضاء

يعتبر الوقت اللازم لتطبيق تقانة الـTILLING على النبات طويلاً نوعاً ما إذا ما أخذ بالاعتبار الوقت اللازم بدءاً من التطفير وحتى غربلة DNA أفراد الجيل الثاني مع المورثة أو المورثات الهدف. ما يهم هنا في موضوع التطفير وحدوث بعض الطفرات الشكلية التي يمكن ملاحظتها في الجيل الأول هو أخذ فكرة أولية عن نجاح عملية التطفير وعن تكرارية هذه الطفرات ضمن الجماعة المطفرة، إذ تعتبر بعض الطفرات البسيطة مثل تغير شكل الجذور وطفرات اليخضور من أكثر الطفرات الشكلية التي تستخدم كمعيار أولي indicator لنجاح عملية التطفير عند الجماعة النباتية المطفرة.

تستخدم عادةً طفرات اليخضور chlorophyll mutations كمؤشر لمدى نجاح عملية التطفيـــر وكمعيار أولي لمعرفة تكـــرار الطفرات عند الجماعة المطفـــرة لدى العديد من النباتات بشكل عام ولدى نبات الشعير بشكل خاص، إذ يكون تأثير الطفرات على المورثات المسؤولة عن تركيب اليخضور هو ظهور نباتات بيضاء نتيجة عدم اصطناع اليخضور chlrorsis أو إنتاج يخضـــور غير كافـــي. إذ أن اليخضور يعطـــي اللون الأخضر لأوراق النبات، فطفرات نقص اليخضور قد تؤدي أيضاً إلى ظهور أوراق شاحبة أو صفراء أو صفراء مائلة للبياض أو بيضاء، وفي هذه الحالة أي الأخيرة لا يستطيع النبات إكمال دورة حياته. إذ أن النباتات المتأثرة تملك القليل أوقد تكون غير قادرة على صنع السكريات carbohydrates من خلال عميلة التمثيل الضوئي نتيجة نقص اليخضور الهام لهذه العملية. أظهرت الدراسة على جماعة الشعير المدروسة Lux أن تكرار طفرات اليخضور (ظهـــور نباتات خضراء شاحبة إلى بيضاء) كان 7% من نسل الجيل الأول و0.9% من نباتات الجيل المطفر الثاني، وهي نسبة مقاربة لتلك التي تم الحصول عليها بالنسبة لطفرات Low-phytate (التي حصل عليها من معاملة جماعة شعير سابقة)، (Rasmussen and Hatzack 1998).

إن نسبة ظهور طفرات الجذور (3%) ونسبة الأنماط الشكلية الأربعة السابقة (3.5%) عند جماعة الشعير LUX المدروسة في هذا البحث هي مقاربة لتلك التي تم الحصول لدى جماعة الشعير Optic (Caldwell et al., 2004)، إذ أنه تم تسجيل اثني

عشـــر نمطاً شكلياً مختلفاً عن النمط البـــري (Optic غير معامل) وقد كانت نسبة هذه الأنماط الاثنا عشر الناتجة عن التطفير 1.96% عند المعاملة بـــ20 ميلي مولار من مادة الـــEMS (تراوحت نسبة الأنماط الشكلية الطافرة من 0.05 وحتى 8.88%) و3.98% عند المعاملة بـــ30 ميلي مولار (من 0.05% وحتى 13.14%)، وقد كانت نسبة طفرات اليخضور عند جماعة الشعير Brake المطفرة في الجيل الثاني 0.5% عند المعاملة بتركيز 20 ميلي مولار من مادة الـــEMS و1.18% عند المعاملة بتركيز 30 ميلي مولار و1.54% عند المعاملة بتركيز 35 ميلي مولار و1.92% عند المعاملة بتركيز 40 ميلي مولار (Gottwald et al., 2009)، فيما اختلفت هذه النسبة عند الجماعات الأخرى المطفرة، فعند جماعة القمح المطفرة (Slade et al., 2005) كانت النباتات التي أظهرت أنماطاً شكلية غير طبيعية أقل من 0.5%، يمكن تفسير ذلك بأن طبيعة القمح (polyploidy) معروفة أنها معزولة جزئياً ضد تأثير الطفرات. في حين تراوحت نسبة الأنماط الشكلية المختلفة عند جماعة الـــSorghum المطفرة من 0.4 وحتى 17.3% لدى 31 نمط شكلي طافر تم تسجيلها عند الجيل الطافر الثالث (Xin et al., 2008)، وقد كانت نسبة الطفرات الشكلية عند نبات الرز Indica Rice IR64 0.68% في نباتات الجيل الطافر الثاني و0.85% لدى نباتات الجيل الطافر الثالث، وهي ناتجة عن معاملة 4000 بذرة بمادة EMS وبتركيز 0.8%. في حين كانت هذه النسبة أعلى عند معاملة نفس العدد من البذور (الحب) بـــ1.6% من مادة الـــEMS، إذ كانت النسبة 0.93% في نباتات الجيل الطافر الثاني و0.31% عند نباتات الجيل الطافر الثالث (Wu et al., 2005). يمكن تفسير تلك الاختلافات (حتى وإن كانت اختلافات صغيرة) وردها إلى سببين رئيسين، الأول هو اختلاف المادة الكيميائية التي تمت بها عملية معاملة النبات في الدراسات المذكورة (مادتي أزيد الصوديوم والـــEMS) وكذلك التركيز المستخدم في كل معاملة، أما السبب الثاني فهو النوع النباتي المطفر، والنمط الشكلي المختلف الذي تم تسجيله، إذ بينت الدراسات أن نسبة أو معدل الطفرات يختلف من نبات لآخر وحتى ضمن نفس النوع يختلف المعدل بين الأصناف وحتى ضمن نفس المجموع الوراثي تكون هناك مناطق أكثر حساسية للتطفير من مناطق الأخرى، (Henikoff and Comai, 2003).

2.1.4. عزل الـــDNA من الأوراق النباتية

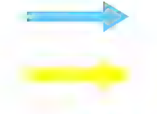
1.2.1.4. إستراتيجية عزل الـــDNA

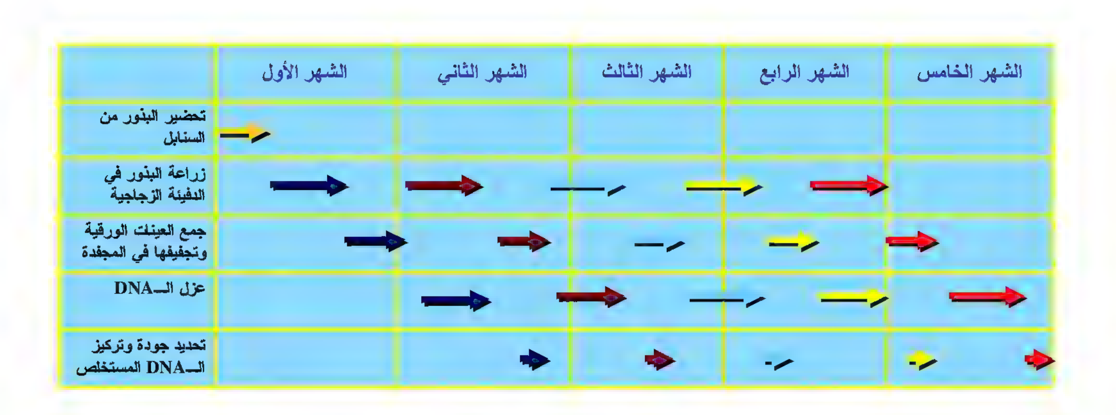
DNA extraction strategy

تم اعتماد إستراتيجية معينة للتعامل مع العدد الكبير من الجماعة النباتية المؤلفة من 10000 فرد تقريباً (9575) من أجل استخلاص الحمض النووي منقوص الأكسجين DNA من كل عينة وذلك بتقسيم الجماعة إلى خمسة مجموعات تألفت كل واحدة منها من 1920 حبة أو بذرة. يمكن تقسيم مراحل عزل الـــDNA من حيث الزمن اللازم للاستخلاص إلى أربعة مراحل أساسية، الأولى مرحلة الزراعـــة (تنمية البذور للحصول على عينات ورقية من أجل عملية الاستخلاص وذلك ضمن الدفيئة الزجاجية)، الثانية مرحلة جمع العينات الورقية وتجفيفها ضمن المجفدة، الثالثة مرحلة طحن الأوراق النباتية وعزل المادة الوراثية (DNA extraction)، المرحلة الرابعة والأخيرة هي مرحلة اختبار جودة وكمية أو تركيز مادة الـــDNA المستخلصة وذلك بتمريرها ضمن هلامة آغاروز، وقد تم العمل ضمن المراحل الأربعة لكل مجموعة من المجموعات الخمسة (1920 عينة لكل مجموعة) كما هو مبين في الشكل 16:

9575 عينة تم تقسيمها إلى خمسة مجموعات (1920 عينة لكل مجموعة)

- المجموعة الأولى
- المجموعة الثانية
- المجموعة الثالثة
- المجموعة الرابعة
- المجموعة الخامسة





شكل 16: يظهر الشكل إستراتيجية العمل لاستخلاص الــDNA بدءاً من تحضير البذور من السنابل، ثم زراعة البذور للحصول على أوراق نباتية وجمع العينات الورقية وتجفيفها إلى استخلاص الــDNA واختبار جودة وكمية الــDNA المستخلصة على هلامة آغاروز.

استغرقت عملية زراعة المجموعة الأولى حتى الحصول على أوراق كافية لعملية استخلاص الــDNA مدة أسبوعين تقريباً، جمعت بعدها العينات الورقية ووضعت في المجفدة، خلال فترة تجفيف العينات الورقية (4-5 أيام) تمت عملية زراعة بذور المجموعة الثانية، بعد ذلك وخلال فترة انتظار نمو أوراق كافية لجمعها من المجموعة الثانية تمت عملية استخلاص الــDNA للمجموعة الأولى، بعد ذلك جمعت عينات المجموعة الثانية، خلال تجفيف العينات الورقية للمجموعة الثانية تم اختبار جودة الــDNA لعينات المجموعة الأولى على هلامة آغاروز، تم بعدها زراعة المجموعة الثالثة، خلال فترة نمو الأوراق تم استخلاص الــDNA للمجموعة الثانية، الخ..، وهكذا حتى الانتهاء من اختبار جودة الــDNA لآخر مجموعة من الــDNA كما هو موضح في الشكل (16). كانت الفترة الزمنية اللازمة لاستخلاص كل مجموعة على حدة هو ما يقارب السبعة أسابيع، وبالتالي استخلاص المجموعات الخمسة كان سيأخذ وقتاً أطول لو تم تحضيرها جميعها معاً ولاستغرق ذلك 35 أسبوعاً في حين تم إنجاز عزل الــDNA لجميع العينات خلال 20 أسبوعاً فقط.

اعتمد بعض الباحثين على تطوير استراتيجيات مختلفة ضمن مراحل تقانة الــTILLING بهدف اختصار الــوقت وتقليل الكلفــة اللازمة للتعامل مــع الجماعات

الكبيــرة العــدد نوعاً ما، فعلــى سبيل المثال استخدمــت طريقة NEATTILL (Arrayed Tissue for TILLING) عند جماعة البندورة المطفرة من أجل عزل الـــDNA، وهي طريقة تعتمد على استخلاص الـــDNA من عدة نباتات في آن واحد (استخدام مزيج أكثر من نبات أو فرد مطفر) يتم بعدها غربلة العينات مع المورثات الهدف باستخدام طريقة مزج لعينات الـــDNA ثنائية البعد Two-dimensional pooling method، (Sreelakshmi et al. 2010).

تعتمــد تقانة الـــTILLING على إحداث طفرات عشوائية ضمن المجموع الوراثي ثم العمل على كشف هــذه الطفرات ضمن جماعة، وإنه من المهم أن تكون هذه الجماعة كبيرة العدد نسبياً ليتثنى الكشف عــن طفرات مفيدة لدراســة وظيفة المورثات باستــخدام تقانة الـــTILLING المذكورة، ويقصــد بالطفرات المفيــدة هنا هو الطفرات التــي تغّير في تركيب البروتين بشكل جذري، فطفرات الإيقاف (راجع فقرة 1.1.2.3.2. وفقرة 2.5.2.) هي الطفــرات الأكثر تفضيلاً لدى تقانــة الـــTILLING، إذ ينتــج عنها بروتين منقوص أو مجتزأ وبالتالي تكون وظيفة البــروتين هنا غائبة تقريباً (حسب مكان الطفرة بالنسبة للمورثة أو المورثات الهدف المدروسة). فإذا أخذنا بعين الاعتبار النسبة الضئيلة لطفرات الإيقاف على سبيل المثال والتي تشكل 3 -4% من مجموع الطفرات النقطية المحدثة (Henikoff and Comai, 2003) فإنه لابد من تطفير جماعة كبيرة العدد نسبياً (من 2000 -10000 فرد حسب تكرار الطفرات الناتج عن المعاملة بالمادة الكيميائية المستخدمة وحسب تركيز هذه المادة المطبق على الجماعة) للحصول على نسبة من الطفرات التي قد تؤثر في الصفة أو الصفات المدروسة الهدف.

هناك عاملان محددان لنجاح عزل الـــDNA من جماعة نباتية كبيرة العدد، وهما الزمن والكلفة اللازمة لمرحلة العزل أو الاستخلاص، فعادةً ما تستعمل محاليل جاهزة (Kits) من قبل شركات مختصة في هذا المجال، ولكن الكلفة المرتفعة لاستخدام هذه المحاليل تحد من استخدامها. بالنسبة لتقانة الـــTILLING، تجمع الأوراق النباتية عادةً من نباتات الجيل المطفر الثاني، هذا وقد تم الحصول على بذور جماعة الشعير Lux من الجيل الثاني

M_2، وقد تمت زراعة هذه البذور في الدفيئة الزجاجية للحصول على أوراق فتية بغية عزل الـــDNA منها.



إن استخدام بعـــض التعديلات على خطوات استخلاص الـــDNA عند جماعة الشعير Lux (طريقة CTAB، Saghai-Maroof et al., 1984) في هذا البحث، كاستخدام أطباق بلاستيكية تحتوي على 96 حفرة سعة 2 ميلي ليتر في مرحلة ترسيب الـــDNA عوضاً عن استخدام أنابيب مفردة، وكذلك جمع العينات الورقية وتجفيفها مباشرةً في أنابيب بلاستكية عوضاً عن استخدام الشاش قد قلل من الوقت اللازم خلال مراحل استخلاص الـــDNA المختلفة (قد ساهم بشكل كبير في اختزال الوقت اللازم لمراحل الاستخلاص للعدد الكبير لجماعة الشعير المروسة)

عادةً ما تستعمل محاليل (Kits) وأدوات جاهزة مصنّعة من قبل شركات خاصة بهدف عزل الـــDNA، إن ميزة هذه الـــkits أنه ليس هناك حاجة لتحضير المحاليل كما أن خطوات الاستخلاص تكون قصيرة وسهلة وكذلك ينتج عنها DNA ذات نقاوة عالية ولكن تبقى مشكلة استخدامها هو التكلفة المرتفعة، إذ توجد شركات متعددة في هذا المجال تنتج هذه الـــkits، ولكن تكلفة استخدامها تبقى في الحد الأدنى أعلى بخمسة أضعاف من استخدام الطرق المخبرية الاعتيادية (طرق الاستخلاص المعتمدة على مادة CTAB أوSDS وغيرها). استخدمت الطريقة المخبرية المعتمدة على الـــUrea/Phenol عند جماعة الشعير المطفرة Optic (Caldwell et al., 2004)، واستخدمت طريقة عزل مشابهة للطريقة المستخدمة مع جماعة الشعير Lux، (استخدام أطباق تحتوي على 96 حفرة) عند عزل الـــDNA مـــن جماعة الأسماك المخططة Zebrafish مع اختلاف بسيط هو استخدام محلول استخلاص محضر من SDS عوضاً عن CTAB، (Wienholds et al., 2003)، وكذلك عند جماعة الضفادع المطفرة *Xenopus tropicalis* (Goda et al., 2006) كما استخدمت طريقة CTAB عند جماعة الـــSorghum المطفرة والمؤلفة من 1600 فرد (Xin et al., 2008). في حين استخدمت kit جاهزة من شركة QIAGEN لعزل

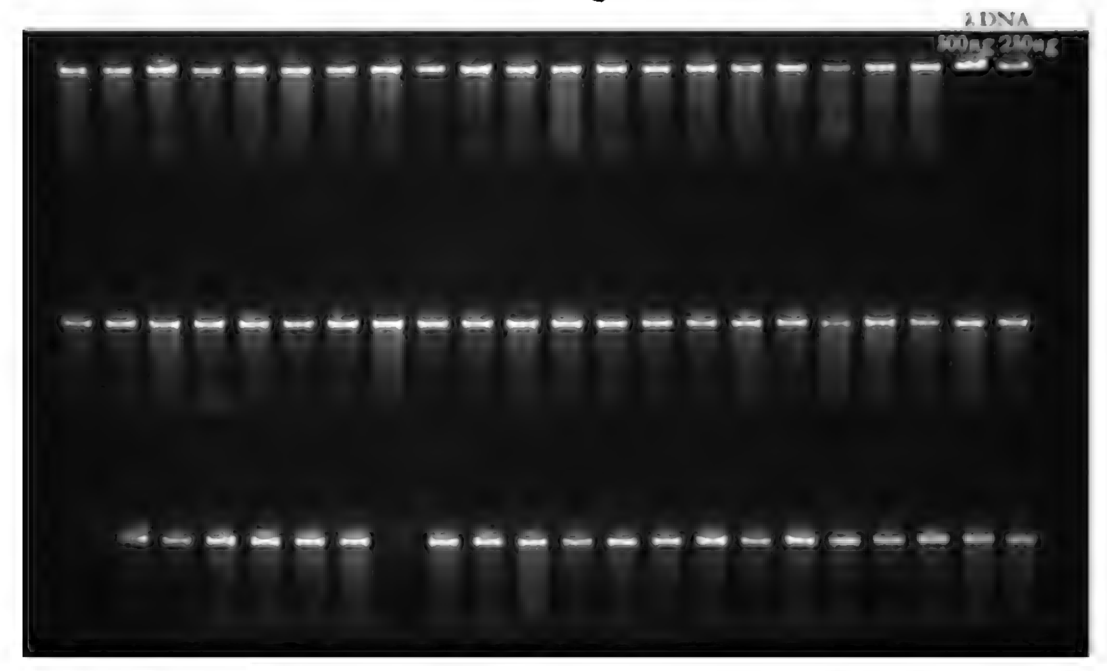
الـــDNA من جماعتي القمح المطفرتين Express وKronos، (Slade et al., 2004)، وkit system FastDNA Bio101 عند استخلاص الـــDNA من جماعة الـــ*Arabidopsis* المطفرة (Colbert et al., 2001) وكذلك عند جماعة الرز Indica Rice (Wu et al., 2005)، كما استخدمت Fastprep DNA Kit من شركة QBiogene (QBiogene Inc/MP Biomedical, Irvine, CA)، لدى جماعة فول الصويا المطفرة، (Cooper et al., 2008a)، وكذلك جماعة الـــ*Drosophila* (Cooper et al., 2008b)، استخدم DNeasy 96 Plant Kit من شركة Quiagen (Quiagen, Hilden, Germany) عند جماعة البندورة المطفرة ، (Minoia et al., 2010).

2.2.1.4. تحديد جودة الـــDNA المعزولة على هلامة آغاروز

DNA quality test on Agarose gel

يبدو الحمض النووي (DNA) المستخلص على هلامة الآغاروز على شكل شرائط أو عصابات مضيئة، حيث تتميز العينات الجيدة باحتوائها على جزيئات DNA ذات وزن جزيئي مرتفع وبالتالي فهي تهاجـــر ببطء ضمن الهلامة، لذلك نجد حزمة من الـــDNA بأعلى الهلا مة دالّة على نوعية جيـــدة من الـــDNA، أما عند حـــدوث تقطعات في شريط الـــDNA أثناء عمليات التحضيـــر فإن ذلك يؤدي إلى الحصـــول على جزيئات DNA تتدرج في أوزانها الجزيئية وتظهر على هلامة الآغاروز على شكل خط مضيء طويل smear أسفل قطع الـــDNA، وتعد العينات ذات جودة عالية عندما تكون خالية من التقطعات، (Sambrook et al., 1989)، وقد أظهر اختبار جودة عينات الـــDNA نوعية جيدة من عينات الـــDNA المستخلصة، إذ كانت خالية من التقطعات وذات تراكيز متقاربة وهي ناحية هامة بالنسبة لتقانة الـــTILLING. كما مكّنت هذه الطريقة أيضاً من تقدير كمية الـــDNA على هلامة الآغاروز من خلال مقارنة الكمية المحمّلة على الهلامة مع عينات DNA قياسية (أو ما يسمى Lambda DNA، وهي عبارة عن DNA مستخلص من آكل الجراثيم Lambda) ذات تركيز ووزن جزيئي معروف وذلك لمقارنة تركيزها مع تركيز العينات المدروسة المتحصل عليها.

كان تركيز عينات الـــDNA المستخلصة متقارباً لدى جميع العينات كم ذكر، إذ كان تركيزها حوالي 500 نانوغرام/ميكرو ليتر، (شكل 17). كان تقارب تركيز عينات الـــDNA مهماً جداً في هذه المرحلة إذا ما أخذ بعين الاعتبار الوقت اللازم لتمديد العينات كلٍ على حدة (قبل البدء بمرحلة التضخيم باستخدام تقانة الـــPCR) فيما إذا كان تركيزها مختلفاً، ونظراً لذلك التقارب فقد كان من السهل تمديد جميع العينات بنسبة تمديد واحدة.



شكل 17: يظهر اختبار مجموعة من عينات الـــDNA من جماعة الشعير Lux المدروسة بعد تمريرها على هلامة آغاروز تركيزها 1%، وتلوينها بصبغة بروميد الايثيديوم، كما يظهر في الجانب العلوي الأيمن عينتي DNA ذات كمية DNA معروفة التركيز (250 and 500 nanogram of Lambda DNA) بهدف استخدامهما لمقارنة تركيز عينات الـــDNA المستخلصة.

2.4. خطوات تقانة الـــTILLING لتحديد الطفرات النقطية

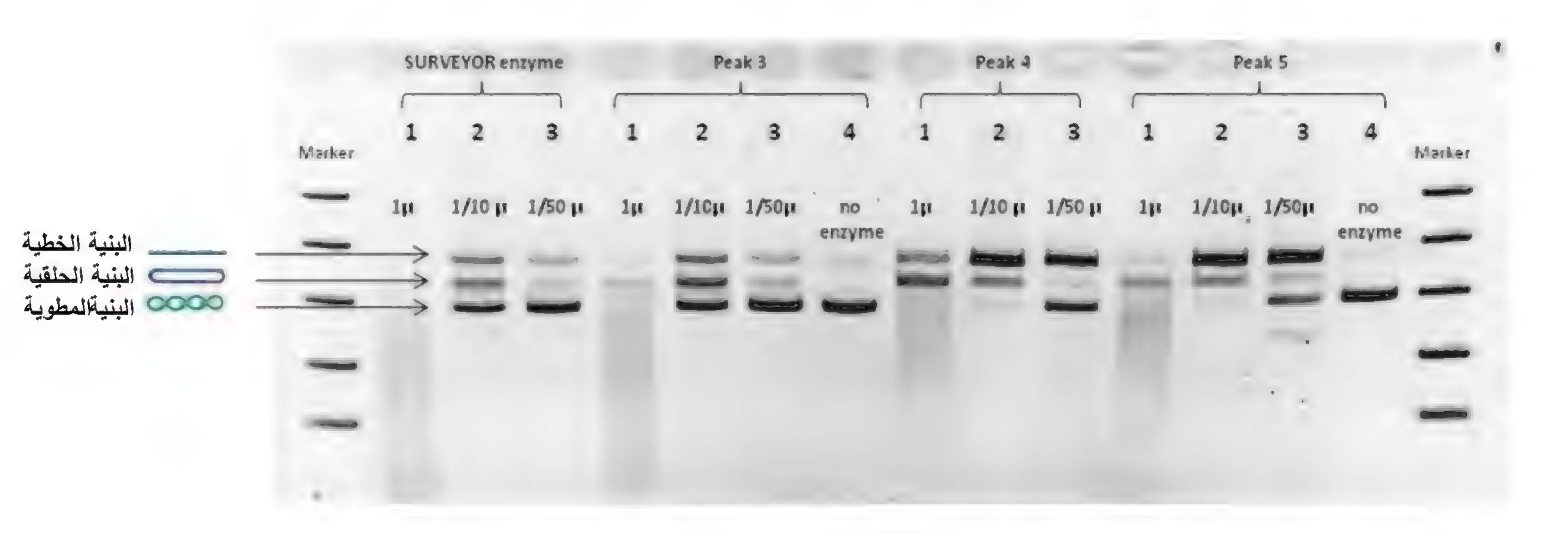
TILLING procedure to detect induced point mutations

1.2.4. تحديد تركيز وفعالية أنزيم القص Cel I الأنسب المستخدم لقص مناطق عدم المطابقة (المناطق ذات الازدواج غير المتجانس)

Detection of the Cel I concentrations and activity for heteroduplex analysis

يعتبر أنزيم Cel I مهماً وأساسياً في الكشف عن مناطق عدم التطابق، يمكن الحصول على هذا الأنزيم من بعض الشركات المتخصصة في إنتاج وتنقية هكذا نوع من الأنزيمات، كما يمكن تحضيره وتنقيته من نبات الكرفس، يعتبر تحضير هذا الأنزيم صعباً نوعاً ما كما أنه يحتاج إلى خطوات طويلة من أجل تنقيته، ولكن إذا ما أخذ بعين الاعتبار الكلفة المرتفعة عند استخدام هذا الأنزيم من الشركات المصنعة فإن تحضيره في المخبر يعد عملاً مهماً ومؤثراً.

تم تحضير وتنقية أنزيم Cel I من نبات الكرفس celery وقد تم استخدام عدة مراحل وأعمدة فصل لتنقيته. تم بعد ذلك تحديد فعالية الأنزيم المستخلص عن طريق استخدام تراكيز مختلفة منه في تقطيع البلاسميد pUC18 وتمرير العينات المقطعة على هلامة آغاروز. أظهرت نتائج الهضم أو التقطيع أن فعالية الأنزيم الأنسب كانت من الجمعة الثالثة Peak3، إذ تم استخدام ثلاثة تراكيز أو كميات وهي 1 ميكروليتر و0.1 ميكروليتر و0.02 (من الأنزيم المستخلص والممدد 300 مرة قبل استخدامه) مع ثلاثة جمعات (Peak3 وPeak4 وPeak5) ناتجة عن تنقية الأنزيم (شكل 18).



شكل 17: يظهر الشكل اختبار فعالية أنزيم القص Cel I وذلك بتطبيقه خاصية القص على البلاسميد pUC18، وتمرير العينات على هلامة آغاروز.يظهر على الهلامة ثلاثة عصابات لكل عينة (أو خط)، تعكس العصابة الأولى البنية الخطية أو المنفردة broken، فيما تظهر القطعة أو العصابة الثانية البنية المفردة أو الحلقية relaxedللبلاسميد، أما العصابة الثالثة فهي تظهر البنية الثانوية أو المطوية supercoiled للبلاسميد.

يظهر على الهلامة في الشكل (17) ثلاثة عصابات لكل عينة (أو خط)، تعكس العصابة الأولى البنية الخطية أو المنفردة broken، فيما تظهر القطعة أو االعصابة الثانية البنية المفردة أو الحلقية relaxed للبلاسميد، أما العصابة الثالثة فهي تظهر البنية الثانوية أو المطوية (الملتفة) supercoiled للبلاسميد. تم اختبار فعالية الأنزيم المستخلص لثلاثة جمعات من الأنزيم المستخلص (Peak3 وPeak4 وPeak5) مقارنةً مع أنزيم Cel I من شركة SURVEYOR ووفق ثلاثة كميات (1 ميكرو ليتر و0.1 ميكرو ليتر و0.02 ميكرو ليتر). أظهرت النتائج أن كمية (0.02 ميكرو ليتر) أدت إلى قص الارتباطات في البنية الثانوية (المطوية supercoiled) للبلاسميد بشكل جزئي، وقد ظهر نتيجتها ثلاثة عصابات على الهلامة (البنية المفردة أو الحلقية والبنية الخطية أو المنفردة والبنية الثانوية أو المطوية للبلاسميد)، في حين أدت كمية (0.1 ميكرو ليتر) إلى قص البنية الثانوية أيضاً بشكل جزئي ولكن لعدد أكبر من جزيئات البلاسميد أما باستخدام كمية 1 ميكرو ليتر فقد قام الأنزيم وبهذا التركيز بقص البنية المطوية والحلقية والمفردة نتيجة الفعالية العالية للأنزيم. تستخدم هذه الطريقة (nicking assay) لاختبار فعالية أنزيم القص المستخلص، إذ تقوم التراكيز المنخفضة من الأنزيم على قص مناطق عدم المطابقة (مناطق تشكل العروة) ولكنه في تدرج من التراكيز الأعلى، يعمل على قص شريط/شريطي الـــDNA في أماكن مختلفة ومتفرقة (يقوم بهضم أو تقطيع شريطي الـــDNA إلى قطع من متوسطة إلى صغيرة حسب كمية الأنزيم المستخدم)، (Yang et al. 2000). هذا ويظهر الشكل أن فعالية وتركيز الجمعة الثالثة (Peak3) كانا الأفضل مقارنةً مع الجمعة الرابعة والخامسة ومقارنةً مع فعالية أنزيم Cel I من شركة SURVEYOR، إذ يظهر الشكل تدرج فعالية القص مع تدرج كمية الأنزيم المستخدم، في حين يظهر الشكل أن فعالية الأنزيم في الجمعة الرابعة والخامسة لم تكن كاملة حتى مع استخدام تراكيز عالية من الأنزيم (1 ميكرو ليتر)، يدل وجود العصابتين الثانية (البنية الحلقية) والثالثة (البنية الخطية) على وجود قص جزئي وغير كامل للبلاسميد. وبناءً على هذه النتيجة، تم فيما بعد استخدام أنزيم Cel I من الجمعة الثالثة (Peak3) علماً أن الكميات المدروسة (0.05 و0.1 و 1 ميكروليتر) استخدمت من الأنزيم المستخلص

والممدد 300/1 (التمديد الأمثل لأنزيم Cel I بعد عزله وتنقيته من نبات الكرفس حسب ما هو موصى به من قبل Yang et al., 2000).

تم استخدام أنزيم Cel I محضّر ومعزول من نبات الكرفس عند معظم الجماعات المطفرة المدروسة، فقد استخدام أنزيم Cel I محضّر من نبات الكرفس لـدى تطبيق تقانة الـTILLING عنـد جماعـة الـ*Arabidopsis* المطفـرة (Till et al., 2004b و Green et al., 2003 و Colbert et al., 2001)، وعند جماعات القمـح المطفرة (Slade et al., 2004 و Uauy et al., 2009)، وعند جماعة الأسماك المخططة Zebrafish (Wienholds et al., 2003)، وعند جماعة الذرة (Till et al., 2004a)، وعند جماعة ذبابة الـ*Drosophila* (Winkler et al., 2005)، وكذلك عند جماعة نبات البندورة المطفرة (Sreelakshmi et al. 2010)، وعند جماعة الديدان *C. elegans* (Gilchrist et al., 2006)، في حين تم استخدام أنزيم Cel I مصنع من شركة Surveyor (Surveyor, Mutation Detection Kit) عنـد جماعة الشعير Optic المطفرة (Caldwell et al, 2004)، واستخدم أنزيم Surveyor Cel I من شركة Transgenomic (Transgenomic, Inc.Omaha, NE) عنـد كلٍ من جماعـة الـSorghum المطفرة (Xin et al., 2008)، وجماعة القمح المطفرة Ventura (Dong et al., 2009)، وكذلك عند جماعة الشعير Brake المطفرة (Gottwald et al., 2009).

2.2.4. تحديد التتابع النكليوتيدي للمورثة *Dhn8* عند الصنف Lux وثلاثة مدخلات شعير سورية:

DNA sequencing of *Dhn8* of Lux and different Syrian barley accessions

من أجل اختبار الظروف المناسبة لخطوات تقانة الـTILLING المراد تطبيقها على جماعة الشعير Lux، كتحديد تركيز الـDNA وكنسبة التمديد اللازمة لتفاعل الـPCR، وكذلك اختبار نسبة المزج لعينات الـDNA الممكن استخدامها مع الإبقاء على حساسية كشف الطفرات ضمن تقانة الكشف عن مناطق عدم المطابقة أو القطع المتخالفة ذات الازدواج

غير المتجانس (الـــHeteroduplex) ممكناً، وتحديد تركيز أنزيم القص Cel I المناسب ضمن مرحلة القص الأنزيمي، كان لابد أولاً من تحديد عينتي DNA ايجابيتين (تحديد التتالي النكليوتيدي لمورثة أو قطعة DNA لعينتين ما متماثلتان في التتالي النكليوتيدي لهذه المورثة وتختلفان عن بعضهما البعض بشفع نكليوتيدي واحد على الأقل، بحيث إذا تم مزج DNA العينتين فإنه من الممكن الحصول على عروة أو مناطق عدم تطابق، وبالتالي يمكن لأنزيم القص أن يقص عندها هذه العروة ويمكن بعدها إظهار قطع الــDNA على هلامة بولي أكريلاميد)، ولهذا الهدف تم تحديد التتابع النكليوتيدي لمورثة الديهيدرين *Dhn8* عنــد عينتي DNA لكل مــن الصنف Lux وثلاثة مدخلات (سلالات) شعير سورية (تم الحصول عليها من بنك المورثات في ايكاردا "ICARDA GenBank").

أظهرت نتائج تحديد التتابع النكليوتيدي لمورثة الديهيدرين عند العينات الخمسة المدروسة وجود تباين في التتابع النكليوتيدي لــDNA هذه المورثة عند الموقع 607 (من بداية البادئة اليمينية المستخدمة هنا) عند أحد المدخلات السورية مقارنةً مع الصنف Lux (استخدمت بادئتين يمينية ويسارية تعملان على تضخيم قطعة من الــDNA، تتضمن قطعة الــDNA هذه التتالي النكليوتيدي لمورثة الديهيدرين *Dhn8* بالإضافة إلى منطقتين قصيرتين قبل شفرة البدء Start codon للمورثة وبعد شفرة التوقف stop codon، الهدف منهما هو الحصول على كامل التتالي النكليوتيدي للمورثة، وقد كانت قطعة الــDNA الناتجة عن التضخيم بطول 1065 شفع قاعدي. أظهرت نتائج التحليل وجود تباينات أخرى مع أحد من المدخلات الثلاثة المدروسة هنا، ولكنها كانت من نوع الإضافة (ثلاثة نكليوتيدات إضافية، يمكن هنا استخدامها في كشف الطفرات، ولكن كان من الأفضل استخدام طفرات مشابهة لتلك الطفرات المحدثة باستخدام المادة المطفرة عند تقانة الــTILLING وهي طفرات نقطية فقط)، في حين كان التتالي النكليوتيدي للمدخل الأخير مطابقاً لذلك عند الصنف Lux، وذلك بالنسبة للتتالي النكليوتيدي عند مورثة الديهيدرين *Dhn8* المستخدمة هنا.

هذا وقد أظهر تحليل ومقارنة التتابع النكليوتيدي لــDNA هذه المورثة عند عينة الصنف Lux غير المعامل مع عينة المدخل السورية HvT225 أن DNA المورثة *Dhn8* عند هذا المدخل تختلف في تتابعها النكليوتيدي عن الصنف Lux بشفع نكليوتيدي واحد، ما يلي:

```
Lux     1081                                             ..........      1140
                                                                   ||||
T225    1081                                             ..........      1140

Lux     1141  ctatataaggacgagtcaTAGCTTGGGCACCTTCATCATTCAGAAAGCCACAAGCCAAGA  1200

T225    1141  ctatataaggacgagtcaTAGCTTGGGCACCTTCATCATTCAGAAAGCCACAAGCCAAGA  1200

Lux     1201  ACCAATAGTCTTTGCTGATCCGCTGTTTTCTCTAGCTCCCACGAGTCTTTAGCTGCACCG  1260

T225    1201  ACCAATAGTCTTTGCTGATCCGCTGTTTTCTCTAGCTCCCACGAGTCTTTAGCTGCACCG  1260

Lux     1261  ACCGATCTCGATCATGGAGGATGAGAGGAGCACCCAGTCATACCAGGGAGCTGAGGCCGA  1320

T225    1261  ACCGATCTCGATCATGGAGGATGAGAGGAGCACCCAGTCATACCAGGGAGCTGAGGCCGA  1320

Lux     1321  TCAGGTGGAGGTGACGGACAGGGGCCTACTCGGCAACCTCCTCGGCAAGAAGAAGGAGGA  1380

T225    1321  TCAGGTGGAGGTGACGGACAGGGGCCTACTCGGCAACCTCCTCGGCAAGAAGAAGGAGGA  1380

Lux     1381  GGAGGACAAGAAGAAGGAGGAAGAGCTGGTTACCGGCATGGAGAAGGTCTCCGTGGAAGA  1440

T225    1381  GGAGGACAAGAAGAAGGAGGAAGAGCTGGTTACCGGCATGGAGAAGGTCTCCGTGGAAGA  1440

Lux     1441  GCCCGAGGTTAAGGAGGATGGCGAGAAGAAGGAGACTCTCTTCTCCAAGCTGCACCGATC  1500

T225    1441  GCCCGAGGTTAAGGAGGATGGCGAGAAGAAGGAGACTCTCTTCTCCAAGCTGCACCGATC  1500

Lux     1501  CAGCTCCAGCTCCAGCTCGGTGAGTGTAAACATGATTTACTAGCGCTTTGCTGTATTAAG  1560

T225    1501  CAGCTCCAGCTCCAGCTCGGTGAGTGTAAACATGATTTACTAGCGCTTTGCTGTATTAAG  1560

Lux     1561  ATTAAGATATCACATGGTTGTTGCGGTTAATTACTGACCTCGTGTGTGATCGTCTGTACA  1620

T225    1561  ATTAAGATATCACATGGTTGTTGCGGTTAATTACTGACCTCGTGTGTGATCGTCTGTACA  1620

Lux     1621  GTCTAGTGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGTCATCGATGAGAACGGTGAGGTGATCAAGAG  1680

T225    1621  GTCTAGTGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGTCATCGATGAGAACGGTGAGGTGATCAAGAG  1680

Lux     1681  GAAGAAGAAGAAGGGTCTCAAGGAGAAGCTCAAGGAGAAGCTGCCCGGCCACAAGGACAA  1740

T225    1681  GAAGAAGAAGAAGGGTCTCAAGGAGAAGCTCAAGGAGAAGCTGCCCGGCCACAAGGACAA  1740

Lux     1741  CGAGGCTGAGCACGTGACGGGCCTACCCGCACCGATGGCCCCCGCGTCTGTTCAGACTCA  1800

T225    1741  CGAAGCTGAGCACGTGACGGGCCTACCCGCACCGATGGCCCCCGCGTCTGTTCAGACTCA  1800

Lux     1801  CCATGACACCGACGTCGTCGTCGAGAAGATCGACGGCGACGCGAAGACAGAGGCCACACC  1860

T225    1801  CCATGACACCGACGTCGTCGTCGAGAAGATCGACGGCGACGCGAAGACAGAGGCCACACC  1860

Lux     1861  GGCAGTGCCCGAGGAGGAGAAGAAAGGCTTCTTGGAAAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG  1920

T225    1861  GGCAGTGCCCGAGGAGGAGAAGAAAGGCTTCTTGGAAAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG  1920

Lux     1921  CGGCCACAAGAAGCCGGAGGACGCTGCCGCCGTGCCCGTCACGCACGCTGCTCCAGCGCC  1980

T225    1921  CGGCCACAAGAAGCCGGAGGACGCTGCCGCCGTGCCCGTCACGCACGCTGCTCCAGCGCC  1980

Lux     1981  AGTGCACGCGCCTGCGCCGGCCGCCGAGGAGGTGAGCAGCCCGGACGCGAAGGAGAAGAA  2040

T225    1981  AGTGCACGCGCCTGCGCCGGCCGCCGAGGAGGTGAGCAGCCCGGACGCGAAGGAGAAGAA  2040

Lux     2041  GGGCCTACTGGGCAAGATCATGGACAAGCTGCCCGGTTACCACAAGACAGGGGAGGAGGA  2100

T225    2041  GGGCCTACTGGGCAAGATCATGGACAAGCTGCCCGGTTACCACAAGACAGGGGAGGAGGA  2100

Lux     2101  CAAGGCCGCCGCCCCTTCAGGCGAGCACAAGCCCAGAGCTTGATCGCCGCCGTGCCCCGA  2160

T225    2101  CAAGGCCGCCGCCCCTTCAGGCGAGCACAAGCCCAGAGCTTGATCGCCGCCGTGCCCCGA  2160
```

```
Lux     2161  GACTCATCACCGGACCTCCATtaaattgttggcgtgtgtcg...................  2220
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
T225    2161  GACTCATCACCGGACCTCCATtaaattgttggcgtgtgtcg...................  2220
```

gcggctatataaggacgagtca	البادئة اليمينية	
cgacacacgccaacaattta	البادئة اليسارية	
atg	منطقة نسخ شفرة البدء	Start codon
tga	منطقة نسخ شفرة التوقف	Stop codon

g التبدل النكليوتيدي (g/c → a/t) مابين DNA الصنف Lux وDNA المدخل الثالث من الشعير T225 (عند الموقع 607 بالنسبة للبادئة اليمينية والموقع 1744 بالنسبة للتتابع النكليوتيدي للمورثة *Dhn8* المنشورة على موقع بنك المورثات)

إن الحجم الكلي لقطعة الـــDNA المضخمة هي 1065 وبالتالي كان حجم القطعتين المتوقع الحصول عليهما على هلامة البولي أكريلاميد والناتجتين عن قص الأنزيم Cel I لمنطقة عدم التطابق نتيجة التباين (الإختلاف) بين عينتي الـــDNA عند الموقع 607 على هلامة البولي أكريلاميد هو الحصول على ثلاثة أنواع من القطع، الأولى بطول كامل 1065 شفع قاعدي، والثانية بطول 607 شفع قاعدي، والثالثة بطول 458 شفع قاعدي.

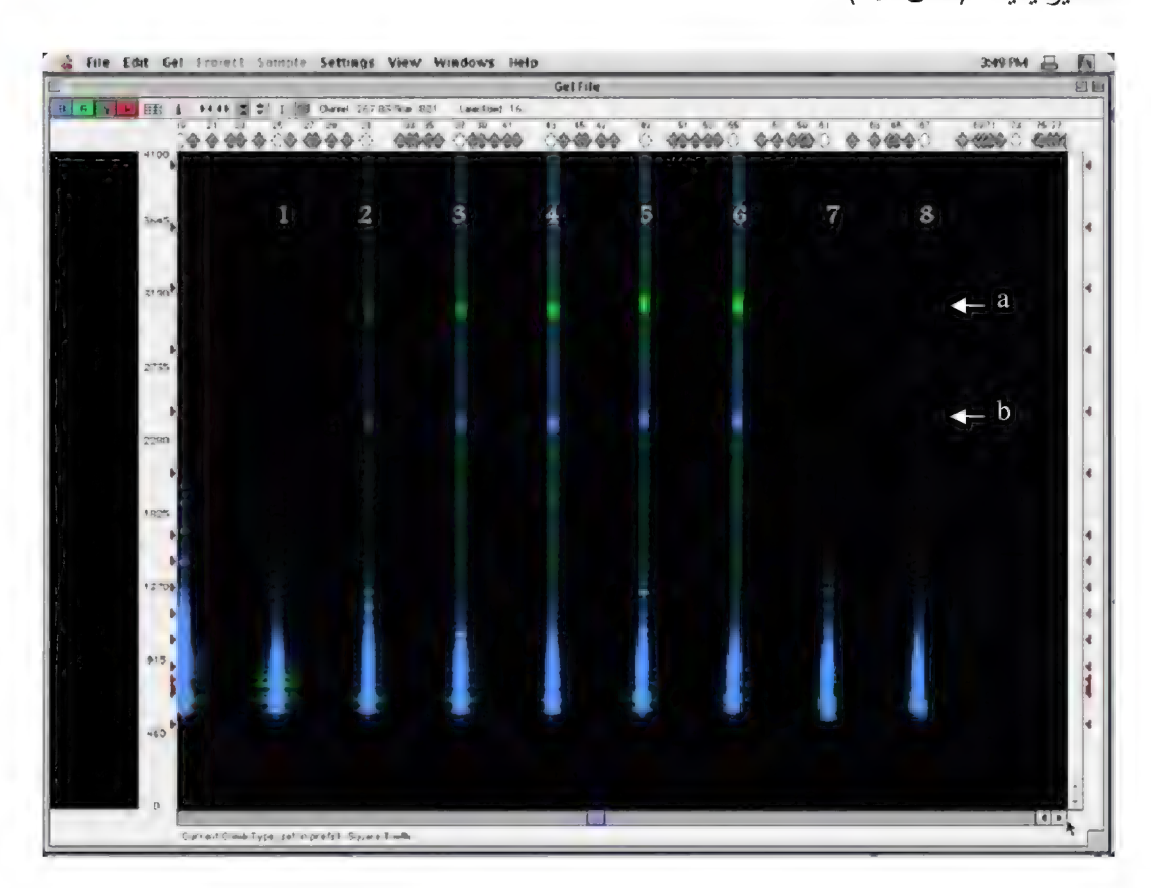
3.2.4. اختبار تراكيز مختلفة من أنزيم Cel I:

Test of different concentration of Cel I

يعتبر أنزيم القص Cel I من الأنزيمات المهمة والفعالة في مرحلة كشف التباينات النكليوتيدية الناتجة عن الطفرات المحدثة عند تقانة الـTILLING. إن التراكيز غير المناسبة من أنزيم القص Cel I المستخدم في المرحلة المذكورة تكون غير قادرة على كشف مناطق عدم التطابق، فالتراكيز الضعيفة قد تكون درجة حساسيتها غير قادرة على قص مناطق عدم المطابقة في قطع الـــDNA الناتجة عن تفاعل الـــPCR (قص جميع نسخ الـــDNA في حال وجود مناطق عدم المطابقة)، في حين أن التراكيز العالية من هذا الأنزيم

يمكن أن تتسبب في قص مناطق عدم المطابقة (إن وجدت) وكذلك في قص أطراف قطع الـــDNA المرتبطة بها البادئات (قص الجزئية المفلورة المرتبطة بالبادئة وبالتالي عدم المقدرة على كشف قطع الـــDNA ضمن هلامة البولي أكريلاميد باستخدام الرحلان الكهربائي)، وفي تراكيز أعلى يمكن أن يقوم هذا الأنزيم بقص عشوائي لمناطق مختلفة من قطع الـــDNA (Oleykowski, 1998).

تم اختبار كميات مختلفة من أنزيم القص Cel I المحضر من نبات الكرفس (01، 0.02، 0.04، 0.1، 0.2، 0.5، 1، 2 ميكرو ليتر)، بهدف حساب التركيز الأمثل والمناسب لعميلة قص مناطق تشكل العرى أو عدم المطابقة للمورثات الهدف المدروسة أو المراد دراستها ضمن جماعة الشعير Lux. هذا وقد أظهرت نتائج اختبار هذه التراكيز من الأنزيم على عينتي DNA إيجابيتين (راجع فقرة 2.2.2.4.) باستخدام مورثة الديهيدرين Dhn8 أن كمية 0.1 ميكرو ليتر من الأنزيم الممدد (300/1) كانت هي الأنسب لكشف التباينات النكليوتيدية، (شكل 19).



شكل 19: يظهر استخدام تراكيــز مختلفة من أنزيم القص Cel I مع عينتي DNA إيجابيتين مضخمتين باستخدام البادئات الخاصة بمورثة الديهيدرين Dhn8 وبوساطة تفاعل الـــPCR، والظاهـــرة على هلامة بولـــي أكريلاميد ضمـــن جهاز رحلان كهـــربائي (ABI PRISM 377 DNA Sequencer). تمثل العينات من 1 وحتى 8 كميات أو تراكيز Cel I المستخدمة في هذا الاختبار (0.01، 0.02، 0.04، 0.1، 0.2، 0.5، 1، 2 ميكرو ليتر من الأنزيم الممدد 300/1). إن كمية الأنزيم (0.01 ميكرو ليتر) لم تكن ذات فعالية كافية لكشف منطقة عدم التطابق المتشكلة ضمن قطع الـــDNA المختبرة هنا، في حين أعطت كلاً من الكميات (0.02 و0.04) فعالية قص ولكن أضعف من الكميات (0.1 و0.2 و0.4 ميكروليتر)، كما كانت كل من كمية الأنزيم 1 و2 ميكرو ليتر ذات فعالية قص عالية وقد أدت إلى عدم ظهور قطع الـــDNA المقصوصة (a وb) نتيجة قص قطع الـــDNA إلى قطع صغيرة وبشكل عشوائي. إن تراكيز 0.1 و0.2 و0.4 كانت متشابهة في فعاليتها في قص مناطق عدم المطابقة وبالتالي تم لاحقاً استخدام كمية 0.1 ميكرو ليتر على اعتبار أن العتبة الدنيا اللازمة لفعالية الأنزيم في قص مناطق عدم المطابقة كانت 0.1 ميكرو ليتر.

علماً أنه تم استخدام عينتين إيجابيتين كما ذكر سابقاً وبحيث تم استخدام كمية DNA من عينة الـــDNA المستخلصة من الصنف Lux أكبر من كمية الـــDNA المستخلصة من عينة المدخل السوري (نسبة 8:1 من T225 DNA:Lux DNA) على اعتبار أنه في اختبار كشف التباين النكليوتيدي في تقانة الـــTILLING يتم على مزيج من عينات الـــDNA وبنسبة من 4 إلى 8 عينات DNA في تفاعل PCR واحد.

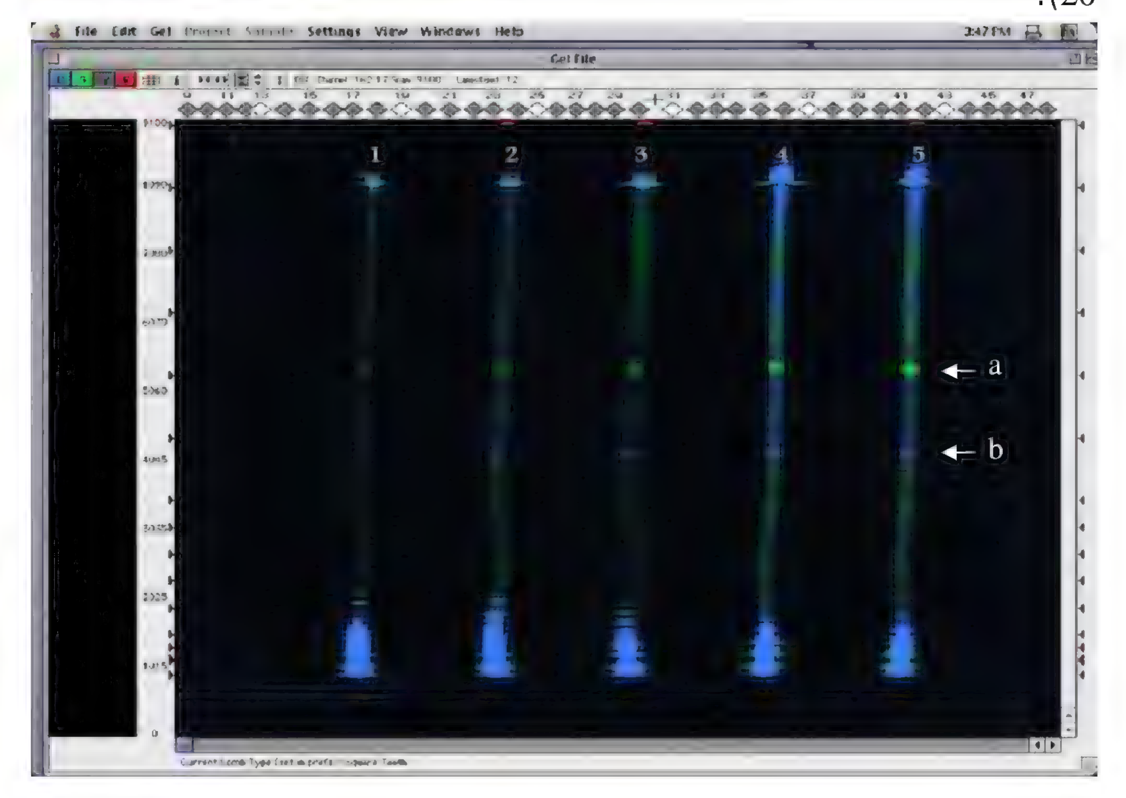
4.2.4. تحـــديد تركيز الـــDNA ونسبـــة التمديد الأمثل مـــن أجل تضخيم المورثات الهدف باستخدام الـــPCR:

DNA concentration and dilution ratio for PCR amplification of target genes

يعتمد مبدأ تضخيم المورثة أو قطعة الـــDNA الهدف في تقانة الـــTILLING على مزج عينات الـــDNA قبل مرحلة استخدام تقانة الـــPCR للتضخيم، وعند مزج العينات يجب تمديد عينات الـــDNA المستخلصة حتى تكون جميع العينات الممزوجة (حسب نسب المزج من 4 وحتى 8 عينات) متقاربة لتكون فرصة الحصول على قطع مضاعفة أو مضخمة

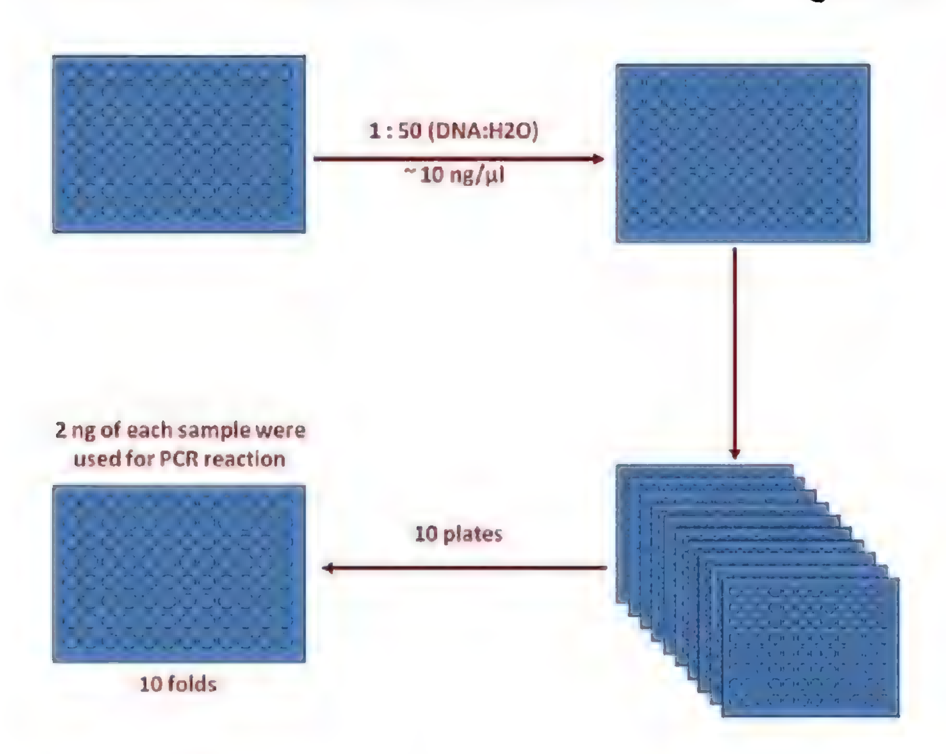
من جميع العينات متساوية. أظهرت نتائج اختبار عينات الــDNA أن تراكيز عينات الــDNA المستخلصة كانت متقاربة، (شكل 15) وبالتالي تم تمديد جميع العينات وفق نفس نسبة التمديد، إذ تم تمديد العينات في البداية وفق نسب تمديد مختلفة لإختبار نسبة التمديد الأمثل.

أظهرت النتائج أن كميات الــDNA 0.12، 0.25، 0.5 نانوغرام (من أصل خمسة كميات تم إختبارها وهي 0.12 و0.25 و0.5 و1 و2 نانوغرام من الــDNA، وهي معادلة لتمديدات H2O:DNA، 500:1، 250:1، 125:1، 50:1، 25:1 أعطت تضخيماً ضعيفاً نوعاً ما في حين كانت كميات 1 و2 نانوغرام متشابهة من حيث قطع الــDNA المضخمة، (على اعتبار أنه إذا استخدمت كمية 1 ميكروليتر من العينات الممدة 50:1 فهذا يعني أنه تم استخدام 10 نانو غرام من الــDNA ومع الأخذ بعين الاعتبار نسبة المزج المستخدمة 10:1 فتكون الكمية النهائية المستخدمة من كل عينة DNA هي 1 نانوغرام)، وعلى اعتبار أن تراكيز الــDNA لعينات الجماعة المدروسة كان مقارباً لــ500 نانوغرام/ميكروليتر)، (شكل 20).



شكل 20: اختبار نسب تمديد مختلفة من الـــDNA (كميات مختلفة من الـــDNA) مع عينتي DNA إيجابيتين، وفيها تظهر شدة الفلورة الناتجة عن البادئات المعلمة المرتبطة بقطع القص (a و b).

لذلك فقد تم استخدام نفس نسبة التمديد لجميع عينات الـــDNA مع المورثات المدروسة في هذا البحث وهي نسبة تمديد 50 مرة) وباستخدام 2 ميكرو ليتر من الـــDNA في تفاعل الـــPCR مع نسبة مزج 10 تكون كمية الـــDNA المستخدمة من كل عينة في تفاعل الـــPCR هي 2 نانو غرام، تم إعتماداً على نتائج النسب المختبرة استخدام نسبة تمديد واحدة لجميع عينات الـــDNA التابعة لأفراد جماعة الشعير Lux، (شكل 21).



شكل 21 يمثل الطريقة المعتمدة في تمديد عينات الـــDNA وكذلك نسبة المزج (10 عينات DNA مختلفة) المستخدمة لاحقاً مع جميع عينات الـــDNA التابعة لجميع أفراد جماعة الشعير Lux. بناءً على ذلك، كانت كمية الـــDNA المستخدمة من كل عينة DNA من أجل تفاعل الـــPCR هي 2 نانو غرام.

استخدمت كمية 2.5 نانو غرام من الـــDNA عند جماعة الشعير Brake المطفرة (Gottwald et al., 2009)، وهي كميـــة مقاربة لتلك التي تـــم استخدامها في هذا البحث مع جماعـــة الشعير Lux. في حيـــن تم استخـــدام كمية 0.015 نانـــوغرام من لـــDNA فـــي تفاعل الـــPCR عند جماعـــة الـــ*Arabidopsis* المطفرة (Till et al., 2003b)، بينما تم استخدام 1.33 و2 و4 نانوغرام من الـــDNA عند جماعتي القمح المطفرتين (Slade et al., 2005)، واستخدمت كمية DNA 2.5 -5 نانوغرام عند جماعة الديدان *C. elegans* (Gilchrist et al., 2006)، و4 نانو غرام عند جماعة البندورة المطفرة (Minoia et al., 2010)، وقد تم اختبار عدة تراكيز من الـــDNA عند نبات البطاطا *Solanum tuberosum* L. تراوحت من 0.015 وحتى 25 نانو غرام، وقد أظهرت النتائج أن كمية 0.25 نانو غرام كانت كفيلة بكشف الطفرات النكيوتيدية المحدثـــة TILLING عند نبات البطاطا (Elias et al., 2009)، كما استخدمت كمية DNA 0.875 -1.25 نانو غرام عند جماعة الـــSorghum المطفرة (Xin et al., 2008)، واستخدمت كمية 0.15 نانو غرام من الـــDNA عند جماعتي فول الصويا المطفرتين (Cooper et al., 2008a).

يمكن رد اختلاف كميات الـــDNA المستخدمة واللازمة لتفاعل الـــPCR عند كل نوع نباتي إلى اختلاف حجم المجموع الوراثي genome size لكل من هذه الأنواع النباتية، فعلى سبيل المثال، إن حجم المجموع الوراثي لنبات الـــ*Arabidopsis* هو 125 ميغا أو ميلون شفع قاعدي (125 Mbp)، وللقمح حوالي 16000 Mb وعند الشعير 5.300 Mb، وبالتالي لاستخدام عدد نسخ متقارب من قالب الـــ DNA (DNA template) في تفاعل الـــPCR فإنه يجب استخدام ثلاثة أضعاف من كمية الـــDNA لدى العمل على نباتات القمح مثلاً.

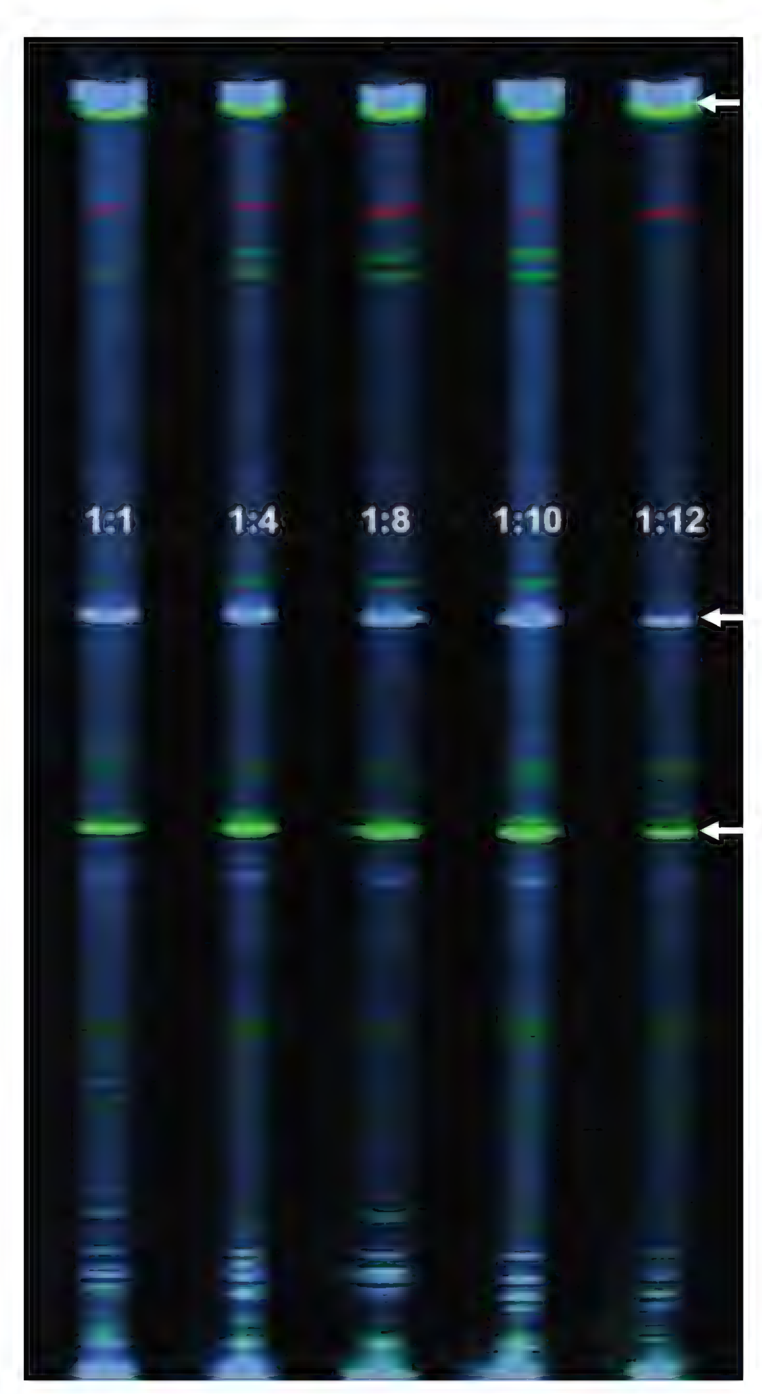
5.2.4. تحديد درجة المزج (Pooling) المثلى لعينات DNA
Determination the best ratio of DNA pools

من أجل اختبار أعلى نسبة مزج من الممكن استخدامها مع الإبقاء على حساسية وإمكانية كشف الطفرات فاعلاً، تم استخدام عينتي DNA من نباتين مختلفين، الأولى عينة DNA مستخلصة من الصنف Lux (غير المعامل بمادة أزيد الصوديوم) والأخرى

مستخلصة من أحد مدخلات الشعير السورية. كما تم توظيف مورثة الديهدرين *Dhn8* لكشف التباين في التتالي النكليوتيدي عند هذه المورثة كما هو مذكور سابقاً (راجع فقرة 2.2.4.).

أظهرت نتائج اختبار نسب المزج أن جميع النسب المدروسة (مزيج كلٍ من عينتي DNA 2 و أربعة عينات 4، وثمانية عينات 8، وعشرة عينات 10، واثنتي عشرة عينة 12) قد أعطت حساسية للقص الأنزيمي، إذ أن أنواع القطع الثلاثة والتي من المفترض وجودها على هلامة الفصل كانت موجودة. كانت شدة اللون للقطع المقصوصة على الهلامة واحدة تقريباً عند النسب (2، و4، و8، و10) في حين كانت أقل شدةً عند النسبة 12 علماً أن شدة اللون تعكس مدى حساسية تحديد القطع المقصوصة، (شكل 22)

إن استخدام قطعة الـــDNA الناتجة عن تضخيم المورثة *Dhn8* مع وجود اختلاف نكليوتيدي واحد بين العينتين وباستخدام أنزيم القص Cel I وكذلك نوعين مختلفين من البادئة اليمينية واليسارية (معلمتين بلونين مختلفين) ضمن خطوات تقانة TILLING أعطى ثلاثة أنواع من قطع DNA على جهاز الرحلان الكهربائي ABI 377، الأولى ذات لون مشترك أزرق وأخضر ناتجة عن وجود القطعة الكاملة المضخمة ضمن PCR، أما الثانية والثالثة فهي قطعة ذات لون أزرق آتية من البادئة العكسية (اليسارية) المعلمة بصبغة 6-Fam ذات الفلورة الزرقاء وقطعة ذات لون أخضر آتية من البادئة اليمينية المعلمة بصبغة Vic ذات الفلورة الخضراء. إن حجم القطعتين السابقتين يجب أن يكون مساوياً لحجم القطعة الكاملة على إعتبار أن هاتين القطعتين ناتجتين عن القص الأنزيمي (Cel I) لمنطقة تشكل العروة أو عدم التطابق (mismatch) للقطعة الكلية. كان طول القطعة الزرقاء 607 شفع نكليوتيدي بينما كان طول القطعة الخضراء 458 شفع نكليوتيدي (مجموعهما يشكل 1065 نكليوتيد وهو مساوٍ للطول الكلي للقطعة المضخمة).



قطعة الـــDNA الكاملة الناتجة عن تفاعل الـــPCR مع البادئات الخاصة بالمورثة *Dhn8* وهي بلونين أخضر وأزرق

قطعة الـــDNA الناتجة عن القص الأنزيمي والمرتبطة بالبادئة المعلمة بالفلورة ذات اللون الأزرق (607 bp)

قطعة الـــDNA الناتجة عن القص الأنزيمي والمرتبطة بالبادئة المعلمة بالفلورة ذات اللون الأخضر (458 bp)

شكل 22: يمثل الشكل إختبار نسب المزج لعينتي DNA إيجابيتين (1:1، و1:4، و1:8، و1:10، و1:12 T225 DNA:Lux DNA)

إذ يظهر الشكل نتائج المزج ممثلةً بصورة منتجات الـــPCR لمورثة الديهيدرين بعد عملية القص باستخدام أنزيم القص Cel I ومن ثم تمريرها على هلامة بولي أكريلاميد على جهاز ABI PRISM 377 DNA Sequencer، وذلك مع عينتي DNA مأخوذتين من الصنف Lux والمدخل السوري المذكور. يظهر على الشكل القطع أو العصابات الناتجة عن التضخيم لمورثة الديهيدرين وبطول 1065 شفــع قاعدي بلون أزرق وأخضر معاً (نتيجة استخدام بادئتين يمينية ويسارية بلونين مختلفين) وكذلك القطع أو العصابات الناتجة عن عملية القص باستخدام أنزيم Cel I نتيجة تشكل منطقة عدم مطابقة وهي بلونين الأولى زرقاء (قطعة الـــDNA المقصوصة والمرتبطة بالبادئة اليمينية) وبطول 607 شفع قاعدي أو نكليوتيدي والثانية خضراء (قطعة الـــDNA المقصوصة والمرتبطة بالبادئة اليسارية) وبطول 458 شفع قاعدي.

عند القيام بتطفير جماعة نباتية باستخدام أحد المطفرات الكيميائية التي تحدث طفرات نقطية، وبهدف استخدام هذه الجماعة في الدراسات الوراثية العكسية، فإنه من المهم أن تكون أفراد هذه الجماعة صغيرة العدد قدر الإمكان بحيث يسهل التعامل معها وكذلك التقليل من الكلفة اللازمة لغربلة هذه الجماعة مع المورثات المراد دراسة أثر التطفير عليها، ولكن المشكلة بالنسبة لنبات الشعير هو أن تكرار الطفرات المحدثة باستخدام مادة EMS وكذلك مادة Sodium Azide منخفض (Caldwell et al., 2004) مقارنةً ببقية المحاصيل كالقمح والـــ*Arabidopsis* مثلاً (Till et al., 2003a وSlade et al., 2005)، وبالتالي للحصول على عدد من الطفرات يمكن الاستفادة منه في دراسة وظيفة المورثة الهدف لابد من تطفير جماعة نباتية لا تقل عن 5000 إلى 10000 فرد، وكذلك فإنه من المهم إيجاد أعلى نسبة مزج بين عينات DNA يمكن الحصول عليها مع الإبقاء على حساسية كشف الطفرات ضمن العينات الممزوجة ممكناً وذلك لخفض حجم العمل وكذلك الكلفة اللازمة للتعامل مع هذا العدد الكبير للعينات من تضخيم القطع الهدف ضمن تفاعل الـــPCR وغيرها من خطوات العمل.

يعد الوصول إلى نسبة مزج عشرة عينات DNA مهماً بالنسبة لمحصول الشعير، إذ كما ذكر سابقاً فإن تكرار الطفرات الناتجة عن استخدام أحد المطفرات الكيميائية المستخدم في

تقانة الـــTILLING (EMS وsodium azide) منخفض مقارنةً مع بقية المحاصيل المطبق عليها هـــذه التقانة، فقد تم استخدام نسبة مزج 8 عند جماعة الشعير Brake المطفرة (Gottwald et al., 2009)، وكذلك عند جماعة الشعير، (Colbert et al., 2001)، وعند جماعات الـــ*Arabidopsis* (Greene et al., 2003 وTill et al., 2003b)، وعند جماعة فول الصويا (Cooper et al., 2008a)، وعند جماعتي نبات البندورة المطفرة (Sreelakshmi et al. 2010 وMinoia et al., 2010)، وعـــند جماعـــة الديـــــــدان *C. elegans* (Gilchrist et al., 2006)، وعـــند جماعـــة الـــSorghum المطفـــرة (Xin et al., 2008)، وكذلك عـــند جماعـــة ذبابة الفاكهـــة الـــ*Drosophila* المطفرة (Winkler et al., 2005)، وعند جماعة *Indica Rice* (Wu et al., 2005)، أما عند جماعات الذرة المطفرة فقد كانت نسبة المزج 4 و8 (Till et al., 2004b)، وعند جماعات القمح المطفرة فقد كانت نسبة المزج 6 (Slade et al., 2005) و4 عند جماعتي القمح، الرباعي Kronos والسداسي Hard Red Spring (Uauy et al., 2009)، وكذلك عند الأسماك المخططة zebrafish (Wienholds et al., 2003)، و5 عند جماعة القمح من الصنف Ventura المطفرة (Dong et al., 2009)، و5 أيضاً عند جماعة نبات اللوتس Lotus (Perry et al., 2009) مع العلم أنه تم استخدام نسبة مزج منخفضة عند الجماعتين الأخيرتين بسبب استخدام نظام رحلان وهلامة فصل مختلفة عن الطرق المستخدمة عادةً مع تقانة الـــTILLING، إذ تم استخدام هلامة فصل من البولي أكريلاميد 3% مع طريقة تظهير تعتمد على مادة بروميد الاثيديوم. أمكن في هذا البحث الوصول إلى نسبة مزج 10 عينات DNA وهي الأكثر كفاءةً والأعلى مقارنةً بتلك المطبقة مع الجماعات الأخرى المطورة بهدف استخدامها في تقانة الـــTILLING.

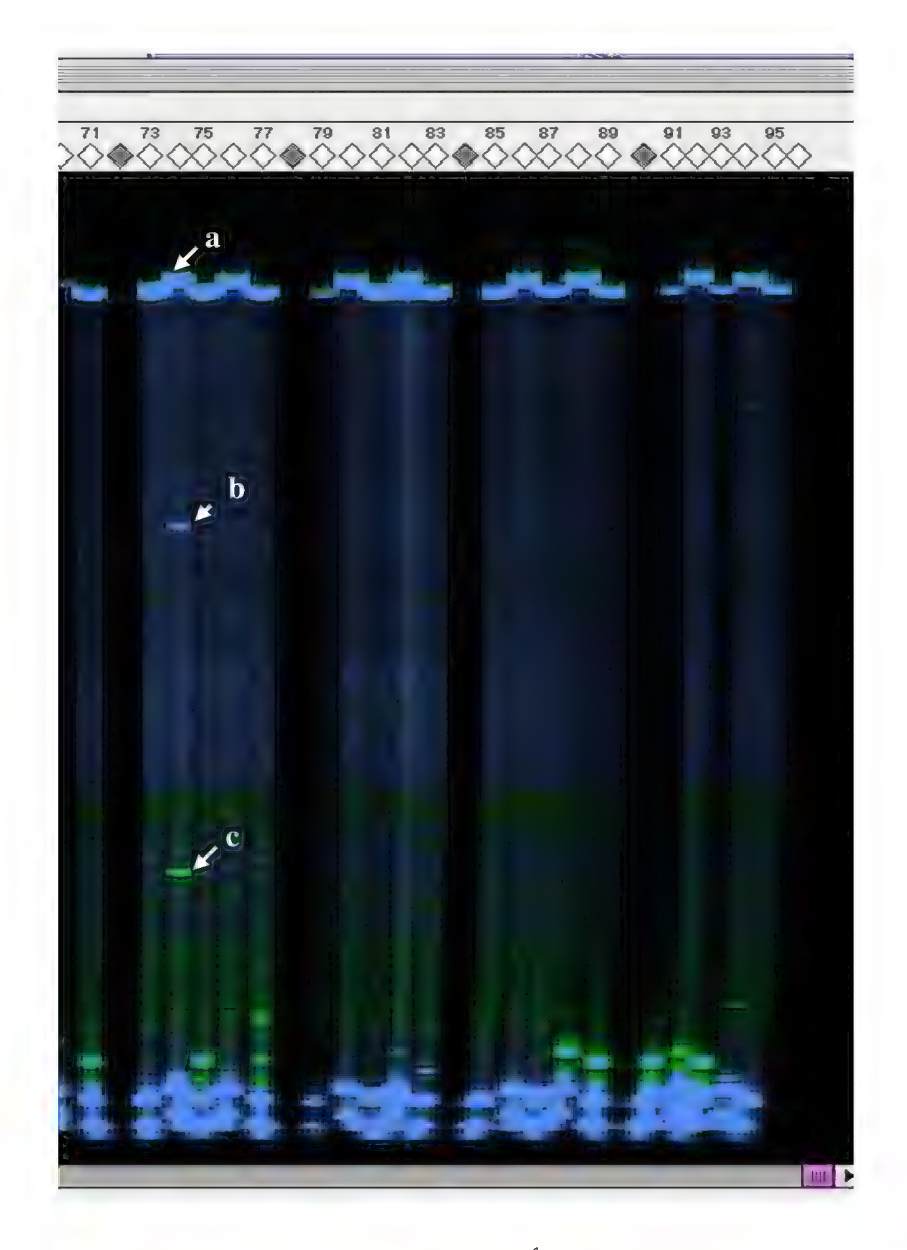
6.2.4. تطبيق تقانة الـــTILLING على جهاز ABI PRISM 377 DNA Sequencer

Heterdoplex analysis detection using ABI PRISM 377 DNA Sequencer

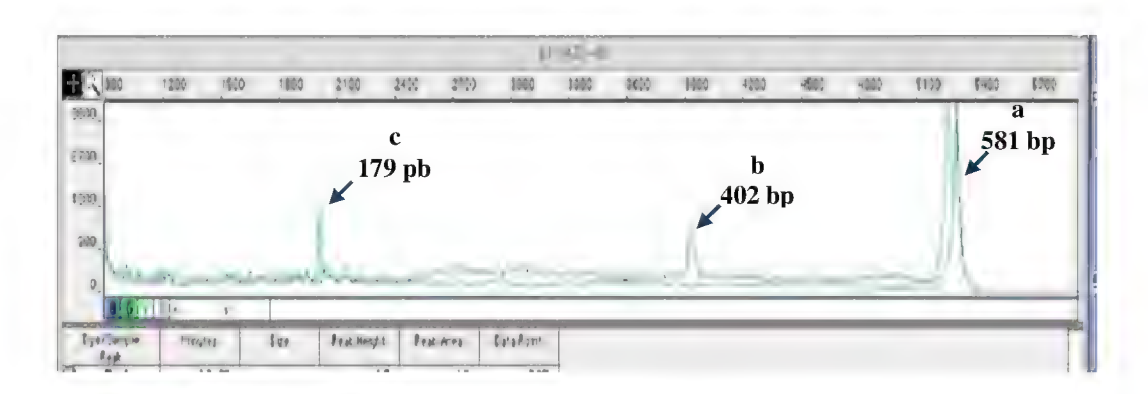
تمت مرحلة كشف التباينات النكليوتيدية (مناطق عدم المطابقة) ضمن تقانة الـــTILLING في بداية ظهورها على جهاز DHPLC (-Denaturing High

Performance Liquid Chromatography)، وهي تقانة لا تحتاج لمرحلة القص الأنزيمي من أجل كشف الطفرات (أو مناطق عدم التطابق في حال وجود التباينات نتيجة الطفرات المحدثة). تم بعدها الانتقال إلى مرحلة أخرى وفيها يتم استخدام أنزيم القص Cel I لقص مناطق عدم المطابقة وتمرير العينات ضمن هلامة بولي أكريلاميد وبوساطة جهاز LI-COR (وهو جهاز رحلان كهربائي يعتمد في كشف قطع الــDNA المهاجرة ضمن الهلامة على استخـــدام بادئات معلمة بمادة مفلـــورة، تكون فيه البادئتيـــن اليمينية واليساريـــة معلمتين بلونين مختلفين) من أجل كشف الطفـــرات ضمن المورثات الهـــدف المضخمـــة ولكن لكل من هذين الجهازين مزاياه ومحدودياته، وقد تم في هذه الدراسة إثبات فعالية استخدام جهاز ABI PRISM 377 DNA Sequencer فـــي كشف الطفرات النقطية المحدثة ومن خلال تقانة الـــTILLING. هذا ولإثبات فعاليـــة وجدوى استخـــدام جهـــاز ABI PRISM 377 DNA Sequencer في مرحلة كشف التباينات النقطية في حال وجودها (مناطق عدم المطابقة) ضمن خطوات تقانة الـــTILLING، تم تطبيق هذه التقانة على عينات DNA من جماعة الشعير Lux وباستخدام مورثتي الديهيدرين *Dhn3* و*Dhn8*. استخدمت في تفاعل الـــPCR بادئات تضخم قطع DNA وبطول 581 شفع نكليوتيدي بالنسبة لمورثة الديهيدرين *Dhn3*، و767 شفع نكليوتيدي بالنسبة لمورثة الديهيدرين *Dhn08* (تختلف البادئات المستخدمة في هذه الفقرة بالنسبة لمورثة *Dhn8* عن البادئات المستخدمة في الفقرة 2.2.4. بمكان توضع البادئة ضمن التتالي النكليوتيدي لمورثة الديهيدرين *Dhn8* فهي هنا مسؤولة عن تضخيم منطقة من المورثة بطول 767 شفع نكليوتيدي)

هذا وقد أظهرت نتائج صور الهلامات وجود عينات ايجابية، تمثلت بوجود ثلاثة قطع على الهلامة، قطعة بلون أخضر وأزرق معاً وهي عبارة عن قطع DNA كاملة، بالإضافة إلى قطعتين واحدة بلون أزرق وأخرى بلون أخضر ناتجتين عن القص الأنزيمي (Cel I). وقد كان طول القطعة الزرقاء 402 شفع نكليوتيدي والخضراء 179 شفع نكليوتيدي عند مورثة الديهيدرين *Dhn3*، في حين كان طول القطعة الزرقاء 456 شفع نكليوتيدي والخضراء 311 شفع نكليوتيدي عند مورثة الديهيدرين *Dhn8*، (شكل 23 و24).



شكل 23: يبين صورة هلامة البولي أكريلاميد عند مورثة الديهيدرين *Dhn3*، وفيه تبدو إحدى عينات الــDNA إيجابية. (a) قطعة DNA بحجم كامل (581 شفع نكليوتيدي)، (b) القطعة الزرقاء الناتجة عن القص الأنزيمي وبطول 402 شفع نكليوتيدي، (c) القطعة الخضراء الناتجة عن القص الأنزيمي وبطول 179 شفع نكليوتيدي.



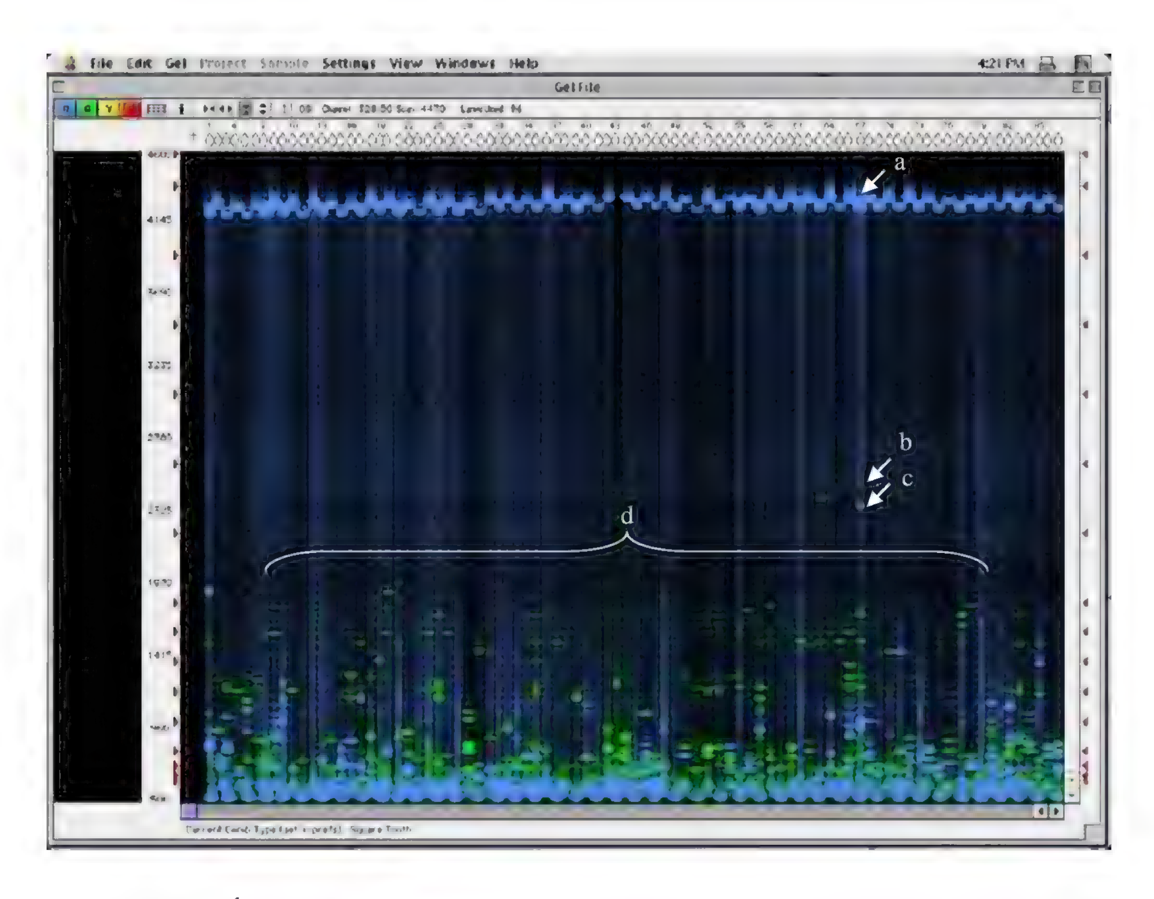
شكل 24: يبين مبدأ تحليل العينات الإيجابية باستخدام برنامج حاسوبي GenScan V3.0، وفيه تظهر قطع الـــDNA المضخمة الكاملة والمقطعة على شكل منحنيات ملونة، إذ يمثل المنحني a قطع الـــDNA الكاملة الناتجة عن تفاعل الـــPCR وهي قطع تظهر بلونين أزرق وأخضر (منحنيين) آتية من البادئتين الخاصتين بمورثة *Dhn3* والمعلمتين بهذين اللونين (581 شفع نكليوتيدي)، في حين تظهر قطع القص (b وc) بشكل منفصل على شكل منحني أزرق (402 شفع نكليوتيدي) ومنحني أخضر (179 شفع نكليوتيدي)

استخـــدم نظام جهاز الرحلان الكهـــربائي LI-COR عنـــد كلٍ مـــن جماعـــة الشعيـــر Brake المطفرة (Gottwald et al., 2009)، وجماعة الـــ*Arabidopsis* المطفرة (Greene et al., 2003 وTill et al., 2003b)، وعند جماعة الـــذرة المطفرة، (Till et al., 2004b)، وجماعة نبات البطاطا (Elias et al., 2009)، وجماعة الـــSorghum المطفرة (Xin et al., 2008)، وعنـــد جماعة فول الصويا المطفرة (Cooper et al., 2008a)، وعند جماعات البندورة المطفرة (Sreelakshmi et al. 2010 وMinoia et al., 2010)، وعند جماعة الديدان *C. elegans* (Gilchrist et al., 2006)، وعند جماعتي القمح المطفرتين (Slade et al., 2004)، وكذلك عند جماعة الأسماك المخططة Zebrafish (Wienholds et al., 2003) أما عند جماعة الـــ*Drosophila* المطفرة فقد استخدمت تقانة الكروماتوغرافيا السائلة DHPLC، (Winkler et al., 2005)، في حين استخدم عند جماعة الشعير المطفرة Optic نظام فصل خاص من شركة Transgenomic (Transgenomic WAVE-HS dHPLC under non-denaturing conditions)، (Caldwell et al., 2004)، أما عند جماعتي القمح المطفرتين Kronos

وHard Red Spring فقد تم استخدام نظام خاص من الرحلان الكهربائي يعتمد على هلامة فصل من البولي أكريلاميد بتركيز 3% وطريقة تظهير باستخدام مادة بروميد الايثيديوم مع استخدام بادئات عادية وغير مفلورة من أجل تفاعل الـPCR، (Uauy et al., 2009) وهي طريقة تعتبر غير مكلفة مقارنةً مع الطرق العادية المستخدمة مع جماعات الـTILLING الأخرى ولكن حساسية الكشف هنا أقل منها لدى تلك المعتمدة على البادئات المعلمة بالفلورة (تم استخدام نسبة مزج عينات DNA 1:2 و1:4 عند هاتين الجماعتين).

هذا وقد أثبتت التجارب في هذا البحث فعالية جهاز الرحلان المستخدم ABI PRISM 377 DNA Sequencer في تحديد قطع القص الناتجة عن استخدام أنزيم القص Cel I مع اثنتين من مورثات الديهيدرين *Dhn3* و*Dhn8*، وكذلك أهمية استخدام هذا الجهاز في زيادة نسبة مزج عينات الـDNA (DNA pool) فقد كانت المرة الأولى التي يتم فيها استخدام نسبة مزج 10 عينات DNA (10 folds).

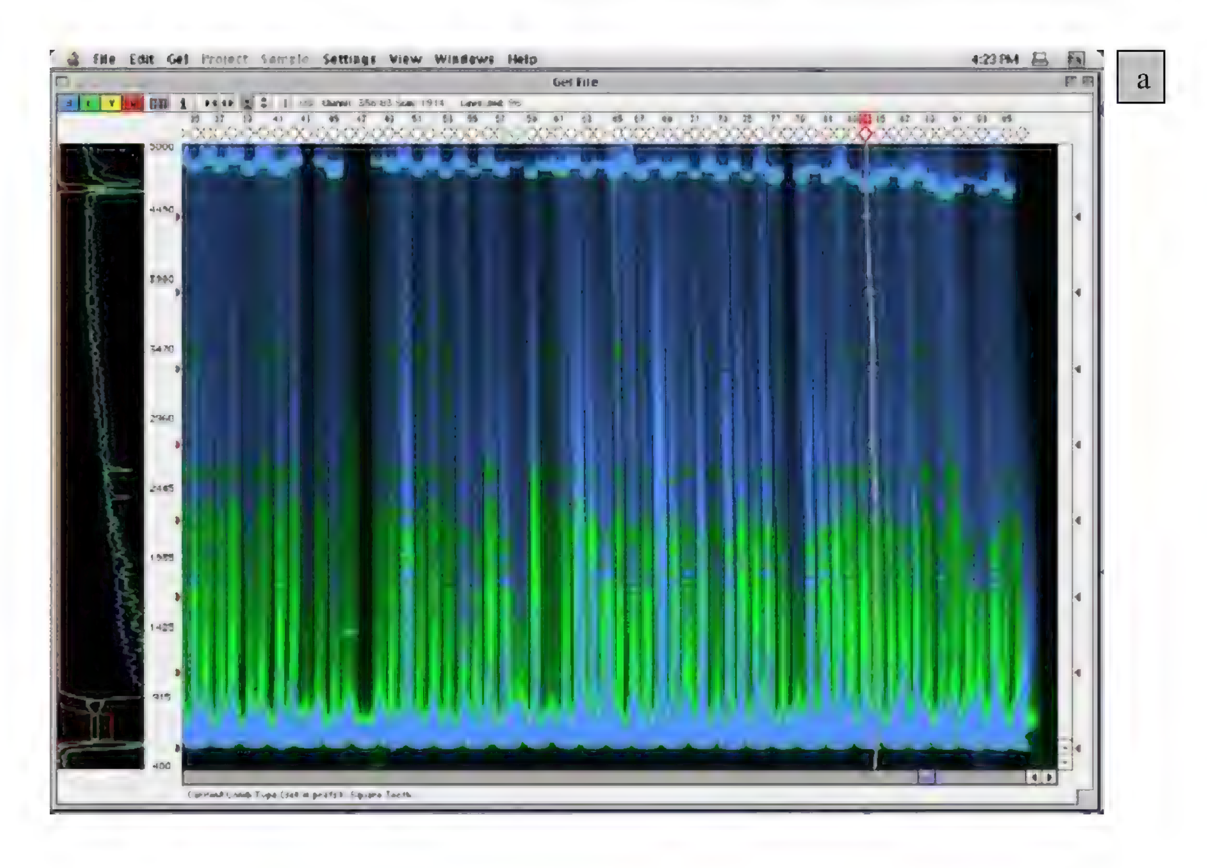
يعتمد مبدأ الـPCR على تضخيم منطقة معينة من الـDNA، تظهر في بعض الحالات عصابات غير نوعية ناتجة عن ارتباط البادئات بمواقع غير محددة 100% للموقع الهدف المراد تضخيمه. هذا وإن من ميزات استخدام جهاز الفصل ABI PRISM 377 DNA Sequencer أنه حتى إذا كانت هناك عصابات غير نوعية في المنتجات الناتجة عن الـPCR فإنه يمكن تجاهلها على اعتبار وجود لونين مختلفين، (شكل 25)، في حين لا يمكن ذلك باستخدام جهاز LI-COR، (شكل 8)

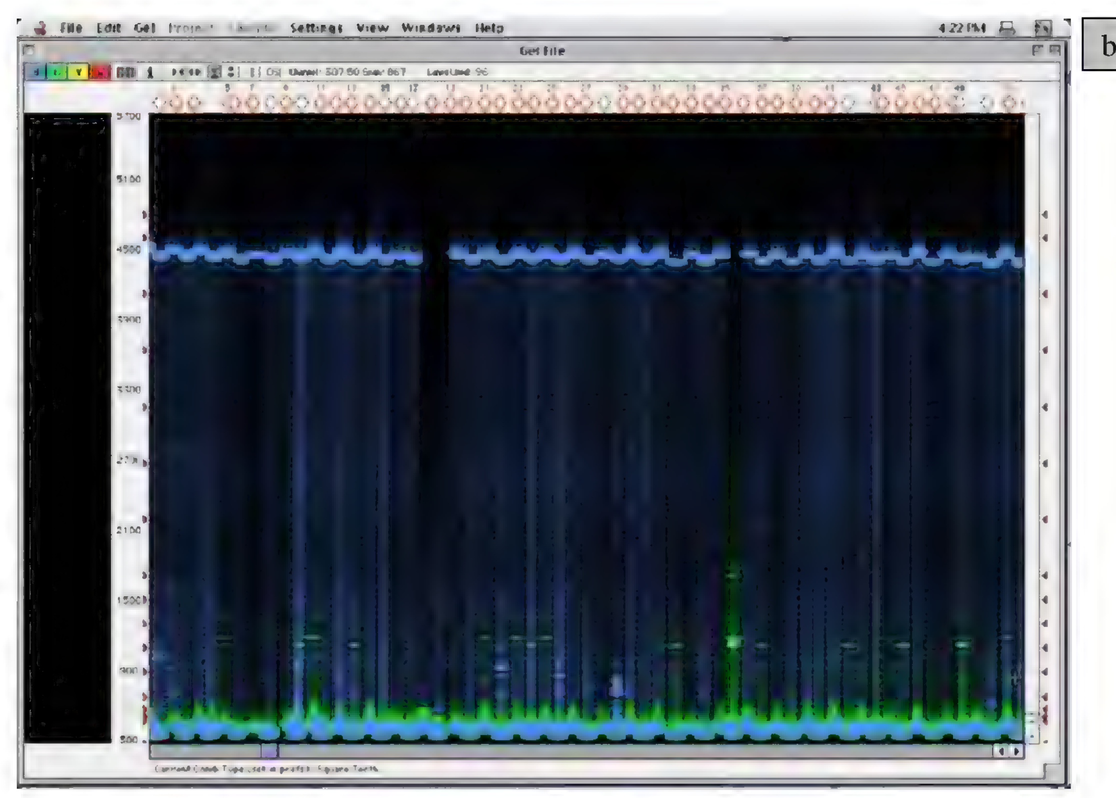


شكل 25: يمثل حالة إحدى صور الهلامات إذ تظهر فيها قطع DNA أو عصابات غير نوعية لمورثة الديهيدرين *Dhn3*، ولكن على اعتبار أن قطع القص تظهر بلونين مختلفين وأن مجموع حجميهما يجب أن يكون مماثلاً للقطع الأصلية، فإنه من السهل تمييز قطع القص (a و b) من العصابات أو قطع الـــDNA غير النوعية (c).

كما يعتمد مبدأ استخدام جهاز ABI PRISM 377 DNA Sequencer على استخدام أشعة الليزر لتحديد الفلورة الناتجة عن قطع الـــDNA التي تعبر ضمن هلامة البولي أكريلاميد، تكسب قطع الـــDNA هذه الفلورة من خلال إضافة جزيئة مفلورة إلى البادئة المستخدمة في تضخيم قطعة الـــDNA الهدف باستخدام الـــPCR. تلي مرحلة الـــPCR في تقانة الـــTILLING ومرحلة القص الأنزيمي، عملية تنقية المنتجات المهضومة (بعد استخدام أنزيم القص أو القطع Cel I) من منتجات الـــPCR وعملية القص اللاحقة باستخدام أنزيم القص Cel I والمتمثلة بالبادئات غير المرتبطة وغيرها من مواد

مفلـــورة قد تنعكس في صورة الهلامة علـــى شكل ألوان البادئات المستخـــدمة، مما يؤثر على تحديد قطع القص في حال وجودها (عند وجود طفرة في أحد عينات الـــDNA). تتم التنقية باستخدام طرق مختلفة، إحدى هذه الطرق تتم باستخدام عمود تنقية من مادة الـــsephadex (G50)، وقد تم في هذا العمل إختبار عينات الـــPCR بعد مرحلة القص بدون أو مع مرحلة التنقية، وقد أظهرت نتائج التجارب أن هذه المرحلة مهمة وأساسية بالنسبة لجهاز الـــABI PRISM 377 DNA Sequencer (شكل 26)، إذ بدون هذه التنقية ظهرت صورة الهلامة مع وجود خلفية عالية من المادة المفلورة. إن وجود خلفية من المادة المفلورة غير مرغوب فيه هنا، إذ قد تؤثر على نتائج الصورة بالنسبة للقطع المقصومة (إن وجدت) والتي تكون أضعف من القطع المفلورة الظاهرة على صورة الهلامة، وبالتالي لا يمكن تميزها ضمن تشويش أو خلفية ذات فلورة عالية.





شكل 26: يمثل صورة هلامة بولي أكريلاميد مع عينات DNA مضخمة بتطبيق تفاعل الـــPCR مع مورثة الديهيدرين *Dhn8*. (a) تظهر على خلفية صورة ألوان زرقاء وخضراء نتيجة عدم استخدام طريقة التنقية لمنتجات تفاعل الـــPCR (عدم استخدام عمـــود تنقية من مادة الـــsephadex، G50)، (b) تظهر نفس العينات ولكن بعد استخدام طريقة التنقية (Sephadex column)

7.2.4. اختبار نسبة التطفير بكشف الطفرات النقطية لدى جماعة الشعير المطفرة Lux وضمن مورثتي ديهيدرين (*Dhn12* و*Dhn13*)

Check of the mutation ratio of Lux mutated population at two *Dhn* loci (*Dhn12*, *Dhn13*)

تم في هذه الدراسة غربلة 9575 فرد lines من جماعة الشعير Lux المطفرة باستخدام مادة أزيد الصوديوم، وقد تم في البداية اختبار تركيز أنزيم Cel I اللازم للقص وكذلك اختبار نسبة مزج العينات للحصول على أعلى كفاءة ممكنة من العمل مع الحفاظ على حساسية عالية تمكّن من كشف الطفرات النقطية عند أفراد الجماعة المدروسة وضمن المورثة

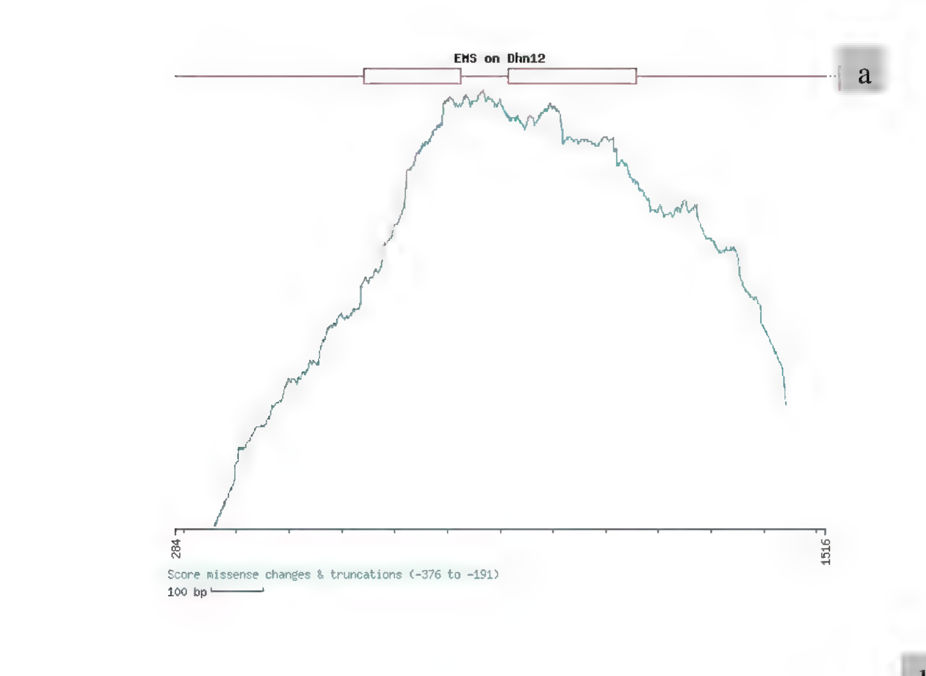
أو المورثات الهدف. بعد أن تم اختبار ظروف تفاعل الـــPCR وكذلك نسبة وتركيز الأنزيم المستخدم ونسبة المزج، جرى إختبار نسبة تكرار الطفرات عند جماعة الشعير Lux بغربلة أفراد الجماعة كاملةً مع اثنتين من مورثات الديهيدرين وهما *Dhn12* و*Dhn13*. هذا وقد تم استخدام نسبة مزج لعينات الـــDNA هي 10 مع كلا المورثتين في تفاعل الـــPCR (تم مزج كل 10 عينات DNA آتية من 10 أفراد معاً وذلك بناءً على نتائج نسبة مزج عينات الـــDNA المختبرة، (راجع فقرة 5.2.4.).

1.7.2.4. استخدام برنامجي CODDLE وPrimer3 لتوقع التبدلات المحتملة للحموض الأمينية وتصميم بادئات خاصة بالمورثتين *Dhn12* و*Dhn13*

Using of CODDLE to predict amino acid changes and design primers for *Dhn12* and *Dhn13*

تم تصميم بادئات من أجل تفاعل الـــPCR وبحيث ينتج عنها قطع DNA وبطول 745 شفع نكليوتيدي بالنسبة لمورثة الديهيدرين *Dhn12* و544 بالنسبة لمورثة الديهيدرين *Dhn13* وذلك بالاعتماد على برنامجي CODDLE وPrimer3، إذ يمكّن البرنامج CODDLE عبر موقعه على الانترنت ومن خلال تزويده بالتتابع النكليوتيدي للمورثة الهدف وكذلك تزويده بمعلومات عن مناطق الانترونات والاكسونات ضمن هذه المورثة، من تحديد مواقع الطفرات النقطية المحتمل حدوثها نتيجة المعاملة بالمادة المطفرة والتنبؤ بجميع التبدلات النكليوتيدية الممكنة وبالنتيجة التبدلات في الحموض الأمينية المترجمة من التتابع النكليوتيدي لهذه المورثة، أما برنامج Primer3 فيمكّن من تصميم بادئات للمناطق التي من المتوقع أن يكون فيها معدل الطفرات مرتفعاً وبالتالي ينتج عنها أكبر نسبة من التغيرات في الحموض الأمينية. هذا ويظهر الشكل (25) نتائج تزويد هذا البرنامج بمعلومات التتابع النكليوتيدي لمورثة الديهيدرين *Dhn12* ونتائج التحليل المتحصّل عليها بوساطة هذا البرنامج، وهي تتضمن المنحني البياني للتباينات النكليوتيدية المفردة المتوقعة نتيجة المعاملة بالمادة المطفرة، تم إدخال المادة المطفرة المستخدمة من ضمن البيانات التي يتم إدخالها للبرنامج وهي مادة EMS (تمت معاملة جماعة الشعير Lux بمادة أزيد الصوديوم وهي ذات تأثير مشابه لمادة

EMS)، كما تم تحديد نسبة الطفرات الناتجة (المتوقعة) لكل نوع طفرة، (شكل 27 و28 وجدول 2 و3).



b

Genomic Sequence

1299 bp

Mutation Method: EMS

- 100.0% G:C -> A:T Transitions

This region is 60.5% ideal, as compared to an ideal target containing only GC.

Polymorphisms should be detected in these proportions:

c

1.4% Truncation Changes (1.1% Nonsense and 0.3% Splice Junction Changes)
21.5% Missense Changes
22.9% Nonsilent Changes

Window size **1300**, centered between **650** and **651** (**1** - **1300**)

Create primers for this window using the Primer3 software package.

d

```
                                                                          0
gaggggctggggaggggtggggagggggctggcccgtgcctgttaagtcattgtgtggcgcataagctct   72
^ ^^^^^^ ^^^^^ ^^^^ ^^^^ ^^^^^^ ^^^^^^ ^^^ ^    ^ ^   ^ ^ ^^^^^   ^^ ^

                                                                          0
cggcgtcacacattacaatgtgtgacgcctgaggcttaggcgtcacacggcttgggggtgggccctctctg  144
^^^^^ ^ ^ ^    ^   ^ ^ ^ ^^^^ ^ ^^^   ^^^^ ^ ^ ^^^^  ^^^^^^ ^^^^^^ ^ ^ ^
                                                                          0
ccagatggtcaggggtgtggcgccgaacggctaggcgtcacacagtgtagtgtggcgaggtgtcaggcgcca  216
^^ ^  ^^ ^ ^^^^ ^ ^^^^^^^  ^^^^  ^^^^ ^ ^ ^ ^ ^  ^ ^ ^^^^ ^^ ^ ^ ^^^^^^
                                                                          0
cacaaaagggttagccgggtgacatattttctctgaaaggtcctccgtgagttctttccgccaggggtcatt  288
^ ^    ^^^   ^^^^^^ ^ ^       ^ ^ ^   ^^ ^^ ^^^ ^ ^  ^   ^^^^^ ^^^^ ^
                                                                          0
tttgtcaattttgccagaaaaacacccgcgagctgatccgtggagtcaccggcgttcacgctccagcgccac  360
   ^ ^      ^^^ ^     ^ ^^^^^^ ^^ ^  ^^^ ^^ ^ ^ ^^^^^^  ^ ^^^ ^^ ^^^^^ ^
                                                                          0
ggcgcatacacacacttgccggtctgtcgtcgaggatagctaacacgtccgcctcccaacccaccacgtatg  432
^^^^^   ^ ^ ^ ^  ^^^^^ ^ ^ ^^ ^^ ^^   ^^   ^ ^^ ^^^^^ ^^^  ^^^ ^^ ^^   ^
                                                                          0
cgccatgggtggcctcccgttctgggtcaggctggcgccgcagcataaaaatacccaccgtgcagcgctaca  504
^^^^  ^^^ ^^^^ ^^^^  ^ ^^^ ^ ^^^ ^^^^^^^^ ^^          ^^^ ^^^ ^^ ^^^^  ^
                                                                          0
aacagaaaatcgggcaaagagaagatcttgagagccttctttttgaagtagctacttccaaacttgaccaa  576
  ^ ^     ^^^^^   ^ ^  ^  ^  ^ ^ ^^^  ^      ^  ^  ^^  ^  ^^   ^  ^ ^^
                                                                  M       1
gagtccagtttgggaccggtgcagaggatagatgatccagcagcaaactcaacagaggtgattgg atg    644
^ ^ ^^ ^   ^^^ ^^^^ ^^ ^ ^^   ^  ^  ^^ ^^ ^^   ^ ^  ^ ^ ^^ ^   ^^   I

E   Y   R   G   Q   Q   D   H   S   V   D   E   Y   G   D   P   V   A     19
gag tac cgg ggg cag cag gac cac tcc gtc gac gag tac ggc gac ccg gtg gct   698
K =   = WQ= RE= * = * = N = Y =  F= I = N = K =   = SD= N = SL= M = TV

V   H   G   S   M   G   A   R   S   A   A   G   A   F   T   G   A   G     37
gtg cac gga agc atg gga gcg cgc tcc gcc gcc ggg gcg ttc acg ggc gcc ggc   752
M = Y = RE   N=   I RE  TV= CH=  F= TV= TV= RE= TV=   =  M= SD= TV= SD=

G   Q   L   Q   H   G   T   E   E   R   K   T   G   G   I   L   R   R     55
ggg cag ctc cag cac ggc acg gag gag cgt aaa acc ggc ggg ata ctg cgt cgc   806
RE= * = F = * = Y = SD=  M= K = K = CH       I= SD= RE=     = = CH  CH=

S   G   S   S   S   S                                                     61
tcc ggc agc tcc agc tcg gtgcggttttgacctctgtgttttatagacatatgcgcatcttcggcc  872
 F= SD=  N=  F=  N=  L= # ^^^^    ^ ^^ ^ ^ ^       ^ ^    ^^^^  ^  ^^^^^


                                              S   A   E   D   D   G   M     68
tgtacgtctttgccagctgtttatttccgttacgtgcttgcag tct gct gag gat gac ggc atg   936
 ^  ^^ ^   ^^^ ^^ ^       ^^^   ^^ ^^  ^^ #  F  TV  K = N   N = SD=   I


G   G   R   R   E   K   G   V   K   E   K   V   K   E   K   L   P   G     86
ggc ggg agg agg gag aag ggc gtg aag gag aag gtc aag gag aag ctc ccc ggt   990
SD= RE=  K=  K= K =   = SD= M =   = K =   = I =   = K =   = F = SL= SD

G   Q   H   M   A   A   G   T   G   A   G   G   A   Y   G   Q   H   T     104
ggg cag cac atg gcc gcg gga act gga gct ggc ggg gct tac ggg cag cac acg   1044
RE= * = Y =   I TV= TV= RE   I  RE  TV  SD= RE= TV    = RE= * = Y =  M=
```

```
A   A   G   T   G   A   G   G   D   Y   G   Q   Q   G   N   A   G   M       122
gcc gcg gga act ggg gcc ggc gga gac tac ggg cag caa ggg aac gca gga atg     1098
TV= TV= RE   I  RE= TV= SD= RE  N =   = RE= * = *   RE=   = TV  RE    I

A   G   E   E   K   G   V   V   D   K   I   K   E   K   L   P   G   Q       140
gcc ggc gag gag aag gga gtc gtg gac aag atc aag gag aag ctg ccc gga cag     1152
TV= SD= K = K =   = RE  I = M = N =   =   =   = K =   = = = SL= RE  * =

H   *                                                                       142
cac tga gctaccggccccggctggctgtccgctgcttactactagtcgtcaagctcgagctgaataaata    1222
Y =  =  ^^  ^^^^^^^^^^^ ^^^ ^ ^^^^ ^^   ^  ^  ^ ^^ ^  ^^ ^^ ^^ ^
                                                                            142
agatgcccgcgatcgatcacgtccgtacctaagatgccgttccagcgtgcgtcgtgttctttcgttttcccc    1294
 ^  ^^^^^^^  ^^  ^ ^^ ^^^  ^^   ^  ^^^^  ^^ ^^^ ^^^ ^^ ^  ^   ^^    ^^^^
                                                                            142
accgcg                                                                      1300
 ^^^^^
```

Exon/Intron Model: 1a(642..824,916..1158)

شكل 27: يبين نتائج تحليل معلومات التتابع النكليوتيدي للمورثة *Dhn12* بوساطة CODDLE (output results). (a) منحني تواتر الطفرات المحتملة (طفرات missense وtruncation بدايةً من الموقع 284 وحتى 1516) ضمن التتالي النكليوتيدي للمورثة *Dhn12*. (b) يمثل مناطق الاكسونات بشكل صناديق والانترونات بشكل خط. (c) الطفرات المحتملة نتيجة المعاملة بمادة EMS (لا يحتوي البرنامج على خيار مادة أزيد الصوديوم كمادة مطفرة، ولكن بالمحصلة فإن تأثير كل من مادة EMS وأزيد الصوديوم هو واحد) وهي: 1.4% طفرات Truncation (1.1% طفرات Nonsense و0.3% طفرات splice junction)، 21.5% طفرات Missense، 22.9% طفرات Nonsilent. (d) التسلسل النكليوتيدي لمورثة *Dhn12* وقد مثلت المواقع التي من المحتمل حدوث الطفرات فيها بـــ ^، كما يمثل السطر الأول الحمض الأميني الناتج عن الثلاثية المشفرة في منطقة التتابع النكليوتيدي، في حين يمثل السطر الثاني التتابع النكليوتيدي للمورثة والسطر الثالث التغيرات المحتملة أو المتوقعة للحوض الأمينية نتيجة التبدل في التسلسل النكليوتيدي المتوقع نتيجة المعاملة بالمادة المطفرة (K, Y, W, Q,...تمثل رمز الحمض الأميني نتيجة التبدل النكليوتيدي المتوقع في الموقع النكليوتيدي، =تعني أن التبدل النكليوتيدي في الموقع سوف ينتج عنها نفس الحمض الأميني (طفرات صامتة)، * سينتج عن التبدل النكليوتيدي طفرة توقف.

تم تصميم بادئات المورثة *Dhn12* اعتماداً على نتائج برنامج CODDLE والتتالي النكلوتيدي المدخل السابق وقد أعطت نتائج برنامج CODDLE والذي يقوم بتصميم البادئات اعتماداً على برنامج آخر هو Primer3 ما يلي:

جدول 2: يمثل البادئات المصصمة من قبل البرنامج Primer3 (بادئات المورثة *Dhn12*)

Primers for *Dhn12*

#	Oligo	Start	Length	Tm	% GC	Any	3'	Sequence
1	Left Primer	491	20	60.20	50.00	8.00	0.00	GTGCAGCGCTACAAACAGAA
	Right Primer	1236	20	60.03	45.00	4.00	2.00	GATCGCGGGCATCTTATTTA
	Amplified Region		746			6.00	1.00	
	Display this pair of primers							
2	Left Primer	489	27	70.607	48.148	8.00	1.00	ACCGTGCAGCGCTACAAACAGAAAATC
	Right Primer	1380	27	69.567	44.444	5.00	1.00	TATTGTTCCGTCTGCATGGAAATCGTC
	Amplified Region		892			8.00	1.00	
	Display this pair of primers							
3	Left Primer	472	26	69.824	50.000	5.00	2.00	GCAGCATAAAAATACCCACCGTGCAG
	Right Primer	1368	27	69.812	37.037	4.00	3.00	TGCATGGAAATCGTCCTTTTTGTTGAA
	Amplified Region		897			5.00	1.00	
	Display this pair of primers							
4	Left Primer	498	27	70.307	44.444	2.00	0.00	CGCTACAAACAGAAAATCGGGCAAAGA
	Right Primer	1380	27	69.567	44.444	5.00	1.00	TATTGTTCCGTCTGCATGGAAATCGTC
	Amplified Region		883			6.00	2.00	
	Display this pair of primers							

5	Left Primer	472	26	69.824	50.000	5.00	2.00	GCAGCATAAAAATACCCACCGTGCAG
	Right Primer	1372	27	70.469	44.444	4.00	0.00	CGTCTGCATGGAAATCGTCCTTTTTGT
	Amplified Region		901			6.00	3.00	

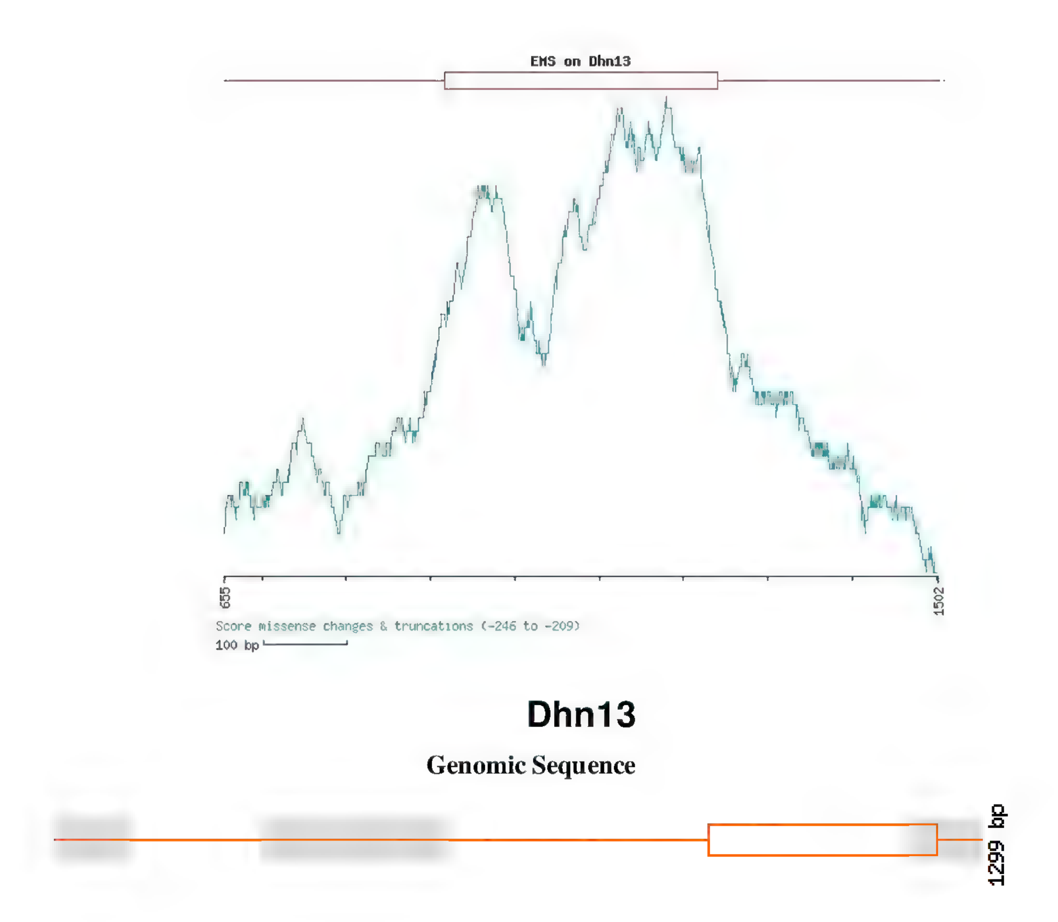
Display this pair of primers

Summary Statistics

	considered	GC content failed	low tm	high tm	high any compl	high end compl	long poly-x seq	high 3' stability	ok
Left Primer	2971	2	1007	1208	5	129	25	118	477
Right Primer	3417	124	1399	1157	2	28	14	93	600
Pair	considered 2916, unacceptable product size 1801, high end compl 181, ok 934								

This program is based on and uses Primer3, which was developed by the Whitehead Institute for Biomedical Research. For more information or to download the original version of Primer3, please visit the Primer3 Software Distribution Page.

يقوم برنامج Primer3 بتصميم بادئتين (يمينية ويسارية) وبعدة احتمالات ضمن المنطقة المراد تضخيمها، وحسب المعطيات المدخلة ضمن هذا البرنامج (توجد خيارات عديدة ضمن هذا البرنامج كدرجة الحرارة اللازمة للارتباط، وطول البادئة، طول القطعة الناتجة،الخ...، يمكن بعدها اختيار أحدهذه البادئات ليصار إلى تطبيقه ضمن تفاعل الـــPCR، وقد تم هنا اختيار البادئات في الاحتمال الأول بالنسبة لكلتا مورثتي الديهيدرين *Dhn12* و *Dhn13*



Mutation Method: EMS

- 100.0% G:C -> A:T Transitions

This region is 50.8% ideal, as compared to an ideal target containing only GC.

Polymorphisms should be detected in these proportions:

0.0% Truncation Changes (0.0% Nonsense and 0.0% Splice Junction Changes)
20.6% Missense Changes
20.6% Nonsilent Changes

Window size **1300**, centered between **650** and **651** (**1** - **1300**)

Create primers for this window using the Primer3 software package.

```
                                                                              0
ctctactgtggggcagtttgtctgcctcttatcatttccacgtggcctcgacatttatgttgtcggtcccaa   72
```

```
                                                                          0
atacgtgtcgccaagatcagtgacctcgagcaagtgggtgaagagccctctcccgcactagtgaggttagga  144

                                                                          0
tgtcgcgacgatccatggtggtttctccacgagatgaggggccactattggccagcctcccggatgcttcat  216

                                                                          0
gtcgtgattcaacaactcgtgttcttactcgatggtgagataggacgtcccgtagtgcatactcccagtgca  288

                                                                          0
ttgtttttttttttgcattgctctctttgtttgattgtttttatctgatataaaatatgctttgtaataag  360

                                                                          0
attttgtcaacacattgtatcactcgattgtccgacctttgtaaatcagggcaaaagactattttaagcata  432

                                                                          0
aatggttagagaagacagcaaggaaataagaaagtcaccccacatacggaagcttttattgattatatttag  504

                                                                          0
cttttattggttatatttataaaacgaggcgaaaacttatttgaagcatagatggtcggagaagatgctctt  576
                                                  ^  ^^ ^^^ ^  ^  ^^ ^
                                                                          0
atgtttcaggaatgccttcaggaatagtatagacacatttgtagagcagaacggttggtacgctgctcgggt  648
  ^   ^ ^^   ^^^  ^ ^^    ^    ^ ^ ^    ^  ^ ^^ ^  ^^^  ^^  ^^^ ^^ ^^^^
                                                                          0
gcacaaagcttgcatcccccaataatcgctgccgatcgccaacgctttccttgtttgattaagcagcagcac  720
^^ ^   ^^  ^^  ^^^^^      ^^^ ^^^^  ^^^^  ^^^   ^^   ^   ^     ^^ ^^ ^^ ^

                                                                          0
gatctgatctcttcctccttatctggtggccctcccatttcttcagacaccctccaccgcaggccacggggc  792
^  ^ ^  ^ ^  ^^ ^^    ^ ^^ ^^^^^ ^^^    ^  ^ ^ ^ ^^^ ^^ ^^^^ ^^^^ ^^^^^^
                                                                          0
cgcgtcccccctcgccgatctataaataccggcgaagacgagccaagcaagatcaacaccatcatcccatccc  864
^^^^ ^^^^^ ^^^^^  ^        ^^^^^^  ^ ^^ ^^^  ^^  ^  ^  ^ ^^  ^  ^^^  ^^^
                                                     M   A   G   I   I    5

attagcgtcctactattcgccattttcctcggagagaagtagggacagcacc atg gcc ggc atc atc  931
    ^^^ ^^  ^    ^^^^     ^^ ^^^ ^ ^  ^  ^^^ ^ ^^ ^^   I TV= SD=   =   =

H   K   I   E   E   K   L   H   M   G   G   S   S   D   E   H   K   K      23
cac aag atc gag gag aag ctc cac atg ggc ggc agc agc gac gag cac aag aag    985
Y =   =   = K = K =   = F = Y =   I SD= SD=  N=  N= N = K = Y =   =   =

D   D   E   H   K   K   A   E   E   H   K   K   K   D   G   E   H   K      41
gat gac gag cac aag aag gcg gag gag cac aag aag aag gac ggc gag cac aag    1039
N   N = K = Y =   =   = TV= K = K = Y =   =   =   = N = SD= K = Y =   =

K   D   G   E   H   K   E   G   M   M   E   K   I   K   D   K   I   S      59
aag gac ggg gag cac aag gag ggc atg atg gag aag atc aag gac aag atc agc    1093
  = N = RE= K = Y =   = K = SD=   I   I K =   =   =   = N =   =   =  N=

G   D   G   H   G   D   G   K   K   D   G   D   H   K   E   K   K   E      77
ggc gac ggc cac ggc gac ggc aag aag gac ggc gac cac aag gag aag aag gag    1147
SD= N = SD= Y = SD= N = SD=   =   = N = SD= N = Y =   = K =   =   = K =


K   K   D   K   K   K   K   K   D   K   K   D   G   E   G   H   K   D      95
aag aag gac aag aag aag aag aag gac aag aag gac ggc gag ggc cac aag gac    1201
  =   = N =   =   =   =   =   = N =   =   = N = SD= K = SD= Y =   = N =



D   D   G   H   S   S   S   S   S   D   S   D   *                          108
gac gac ggc cac agc agc agc agc agc gac agc gac tga gcgacctccggccgcgctcc   1260
N = N = SD= Y =  N=  N=  N=  N=  N= N =  N= N =   = ^^^ ^^ ^^^^^^^^^^ ^^

                                                                           108
```

```
ggcggcgtgcaggtgcaggtaccgtctccatgcgtgcctc                              1300
^^^^^^^ ^^ ^^ ^^ ^^  ^^^ ^ ^^  ^^^ ^^^ ^
```

Exon/Intron Model: 1a(917..1240)[291,12]

شكل 28: يبين الشكل نتائج تحليل معلومات التتابع النكليوتيدي للمورثة *Dhn13* بوساطة CODDLE (output results). الطفرات المحتملة نتيجة المعاملة بمادة EMS هي: 0.0% طفرات Truncation (0.0% طفرات Nonsense و0.0% طفرات splice junction)، 20.6% طفرات Missense، 20.6% طفرات غير صامتة.

جدول 3: يمثل البادئات المصممة من قبل البرنامج Primer3 للمورثة *Dhn13*

Primers for *Dhn13*

#	Oligo	Start	Length	Tm	% GC	Any	3'	Sequence
1	Left Primer	813	20	60.22	50.00	4.00	0.00	TAAATACCGGCGAAGACGAG
	Right Primer	1357	20	60.80	50.00	2.00	2.00	CCAACAAGAAGCCAAGAACG
	Amplified Region		730			3.00	1.00	
	Display this pair of primers							
2	Left Primer	751	27	71.366	55.556	4.00	0.00	CCTCCCATTTCTTCAGACACCCTCCAC
	Right Primer	1492	27	69.932	48.148	4.00	0.00	AGCCCAGCCGGTTATTACATCACAAGA
	Amplified Region		742			4.00	0.00	
	Display this pair of primers							
3	Left Primer	836	27	68.984	44.444	4.00	0.00	AAGCAAGATCAACACCATCATCCCATC
	Right Primer	1560	27	68.479	48.148	3.00	2.00	CATCAATACCAACACGACTCCTCAACG
	Amplified Region		725			3.00	1.00	
	Display this pair of primers							
4	Left Primer	832	27	70.843	48.148	4.00	0.00	AGCCAAGCAAGATCAACACCATCATCC
	Right Primer	1560	27	68.479	48.148	3.00	2.00	CATCAATACCAACACGACTCCTCAACG
	Amplified Region		729			3.00	1.00	

Display this pair of primers

5	Left Primer	827	27	70.637	48.148	4.00	2.00	AGACGAGCCAAGCAAGATCAACACCAT
	Right Primer	1560	27	68.479	48.148	3.00	2.00	CATCAATACCAACACGACTCCTCAACG
	Amplified Region		734			4.00	1.00	

Display this pair of primers

Summary Statistics

	considered	GC content failed	low tm	high tm	high any compl	high end compl	high 3' stability	ok
Left Primer	1328	197	509	259	4	3	44	312
Right Primer	1494	8	1056	234	0	7	17	172
Pair	considered 1114, unacceptable product size 1077, ok 37							

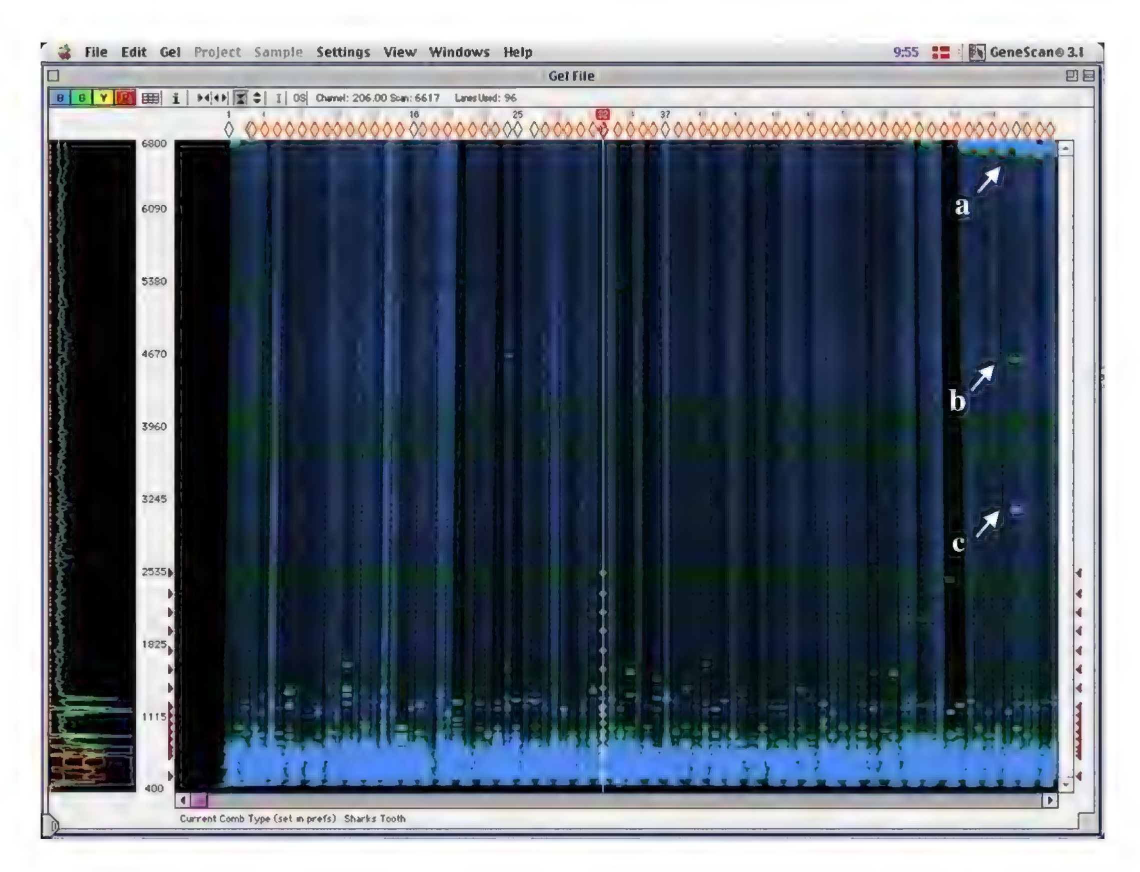
استخدم برنامج CODDLE لتوقع التبينات النكليوتيدية المفردة وتصميم بادئات للمورثات الهدف المدروسة لدى معظم الدراسات على جماعة الـTILLING المطفرة، فقد تم استخدامه عند كلٍ من جماعة الشعير Barke (Gottwald et al., 2009)، وجماعة البندورة المطفرة (Minoia et al., 2010) وجماعات القمح المطفرة (Uauy et al., 2009 و Dong et al., 2009)، وجماعة الـSorghum (Xin et al., 2008)، وجماعة الذرة المطفرة (Till et al., 2004a)، وجماعة الـ*Arabidopsis* (Till et al., 2003a)، وجماعة الديدان *C. elegans* (Gilchrist et al., 2006)، وجماعة اللوتس Lotus (Horst et al., 2007)، وجماعة فول الصويا (Cooper et al., 2008).

2.7.2.4. كشف التباينات النكليوتيدية عند المورثتين *Dhn12* و *Dhn13*

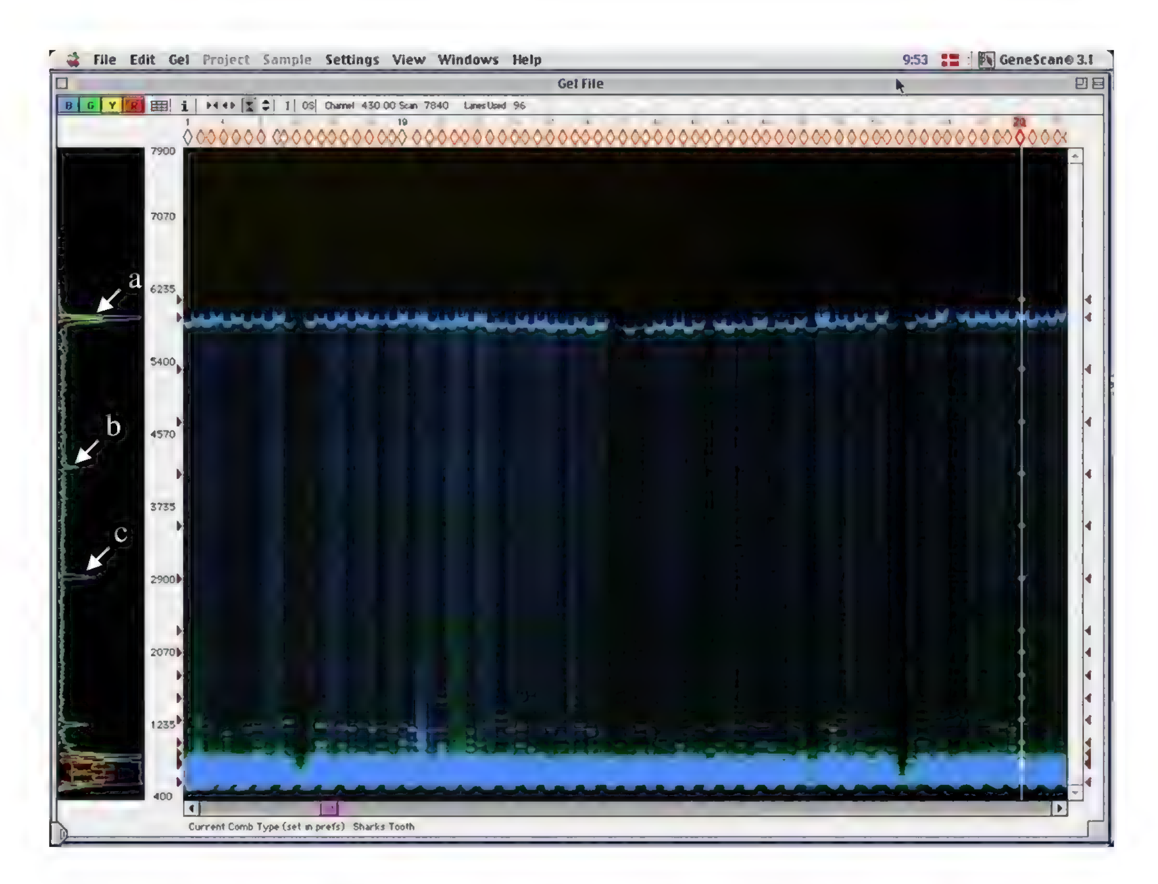
Detection of point mutation of *Dhn12* and *Dhn13*

هذا وقد تم تطبيق تفاعل الـPCR على جميع عينات الـDNA المعزولة من أفراد جماعة الشعير (9575)، ومع استخدام نسبة مزج 10 تم تطبيق تفاعل الـPCR الأول مع 950 مزيج (pools) لكل مورثة. استخدم بعدها أنزيم القص Cel I لكشف مناطق عدم المطابقة والتي في حال وجودها تعكس وجود طفرة لدى إحدى العينات العشرة الممزوجة.

مررت بعدها العينات على هلامة بولي أكريلاميد وبتركيز 7% ضمن جهاز ABI-377. تحتوي كل هلامة على 96 حفرة وبالتالي تتسع كل هلامة لـ96 عينة PCR. أظهرت نتائج تحليل صور الهلامات وجود ثلاثة هلامات تحتوي عل ثلاثة عينات إيجابية (وجود قص في منتجات الـPCR وبالتالي ظهور ثلاثة أنواع من قطع الـDNA) على الهلامة لكل عينة بالنسبة لمورثة الديهيدرين *Dhn12* (شكل 29)، ووجود هلامتين تحوي على عينتين إيجابيتين بالنسبة لمورثة الديهيدرين (شكل 30) *Dhn13*.



شكل 29: يمثل صورة الهلامة لإحدى العينات الإيجابية عند مورثة الديهيدرين *Dhn12*، من أصل 10 صور هلامات تم تحميل جميع عينات جماعة الشعير عليها Lux (الناتجة عن تفاعل الـPCR لمورثة *Dhn12*). (a) قطعة الـDNA الكاملة، (b) القطعة الأولى الناتجة عن القص الأنزيمي، (c) القطعة الثانية الناتجة عن القص الأنزيمي وكلتاهما في عينة مزيج أظهرت صورة الهلامة أنها تحتوي على تباين نكليوتيدي.



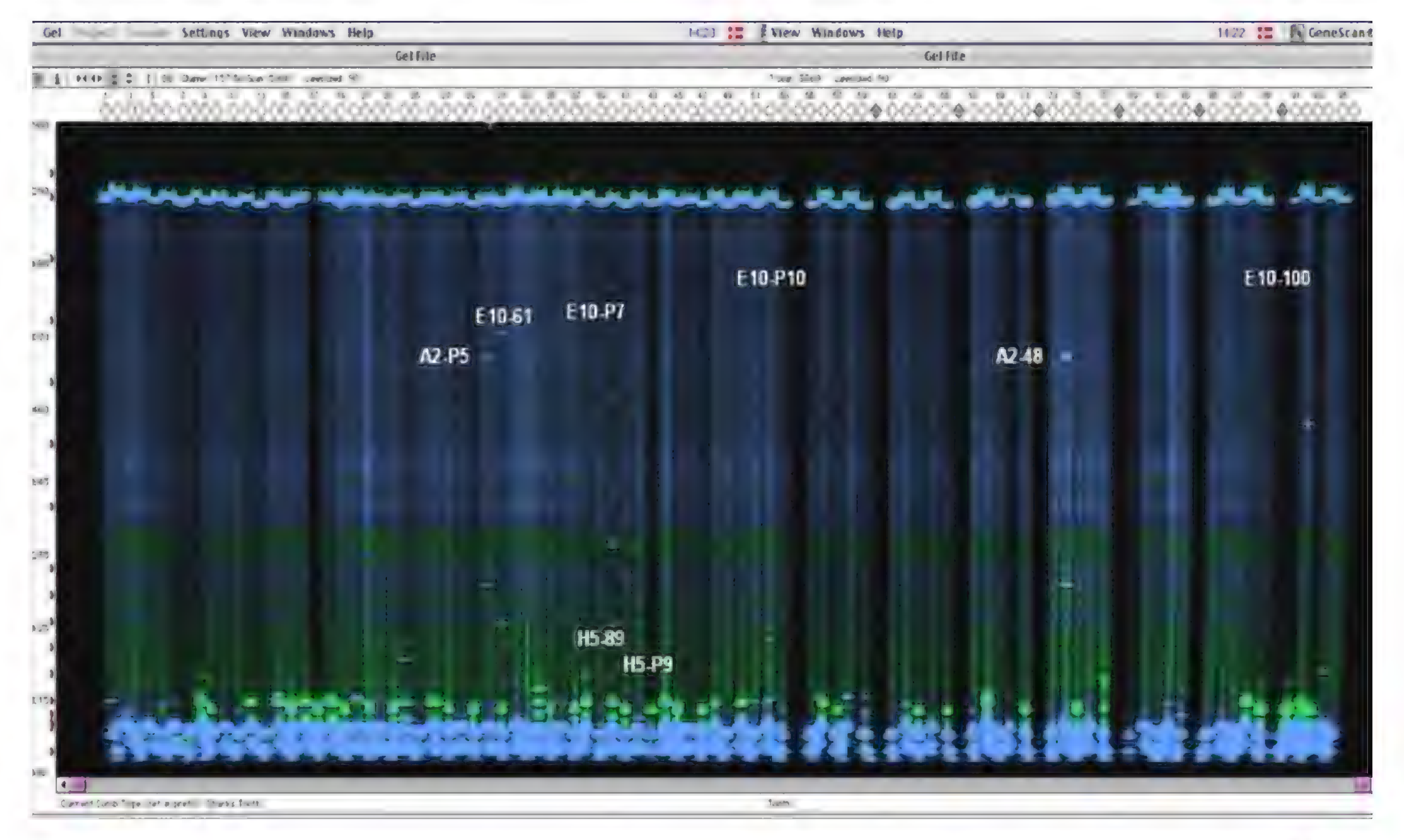
شكل 30: يمثل صورة الهلامة لإحدى العينات الإيجابية عند مورثة الديهيدرين *Dhn13*، من أصل 10 صور هلامات تم تحميل جميع عينات جماعة الشعير عليهاLux (الناتجة عن تفاعل الـــPCR لمورثة *Dhn12*). (a) قطعة الـــDNA الكاملة، (b) القطعة الأولى الناتجة عن القص الأنزيمي، (c) القطعة الثانية الناتجة عن القص الأنزيمي وكلتاهما في عينة مزيج أظهرت صورة الهلامة أنها تحتوي على تباين نكليوتيدي .

بعد أن تم تحديد العينات (pools) الإيجابية الخمسة عند المورثتين *Dhn12* و*Dhn13*، عُمد إلى تحديد أية عينة من العينات العشرة في كل مزيج pool (العينات الايجابية) كانت تحتوي على الطفرة، وقد تم ذلك عن طريق مزج كل عينة DNA من العينات العشرة ضمن مزيج عينات الـــDNA الخمسة الإيجابية مع عينة DNA من الصنف Lux (مزج كل عينة على حدة مع DNA مأخوذة من النمط البري من الصنف Lux)، يقصد بالنمط البري، النباتات غير المعاملة بالمادة الكيميائية المطفرة (كما ذكر سابقاً)، كما تم

إجراء تفاعل الـــPCR مع البادئات الخاصة بمورثتي الديهيدرين *Dhn12* و*Dhn13* (البادئات الخاصة بمورثة *Dhn12* مع تلك العينات الايجابية من صور هلامات *Dhn12*، والبادئات الخاصة بمورثة *Dhn13* مع العينات الإيجابية من المحددة من صور هلامات *Dhn13*). بعد ذلك تم استخدام أنزيم القص Cel I ومن ثم تنقية العينات وتمريرها على هلامة بولي أكريلاميد.

تم عن طريق صور الهلامة الناتجة تحديد خمسة عينات ايجابية تم ردها إلى خمسة طفرات ضمن خمسة عينات DNA مفردة (كل عينة من أصل عشرة عينات ممزوجة تم فحصها بشكل فردي)، (شكل 31).

بعد أن حددت العينات التي تحوي على الطفرات الخمسة، تم تحديد التتابع النكليوتيدي لمنتجات الـــPCR للقطع الخمسة من الـــDNA (ثلاثة قطع تابعة للمورثة *Dhn12* وقطعتان تابعتان للمورثة *Dhn13*)، أظهرت نتائج تحليل التتابع النكليوتيدي لـــDNA القطع الخمسة أن ثلاثة طفرات من أصل خمسة كانت ضمن منطقة الـــexsons، وواحد قبل شفرة البدء عند مورثة الديهيدرين *Dhn12*، والأخيرة بعد شفرة التوقف عند مورثة الديهيدرين *Dhn13*، (الشكل 32).



شكل 31 : يظهر تحديد العينات الإيجابية الخمسة عند كلٍ من مورثتي الديهيدرين *Dhn12* و*Dhn13*، فعلى سبيل المثال يمثل الخط الذي يحتوي على العينة A2-P5 عينة المزيج الايجابية التي تحتوي قطعتي DNA بالإضافة للقطعة الكاملة الناتجة عن القص الأنزيمي، في حين يمثل الخط الذي يحتوي على العينة A2-48 إحدى العينات العشرة من العينة A2-P5(مزيج عشرة عينات) التي تم تأكيد وجود قطع القص ضمنها وبالتالي تأكيد وجود طفرة ضمن المورثة *Dhn12* عند هذه العينة

A

```
>Dhn12
gtgcagcgctacaaacagaaaatcgggcaaagagaagatcttgagagccttctttttga
agtagctacttccaaacttgaccaagagtccagtttgggaccggtgcagaggatagatga
tccagcagcaaactcaacagaggtgattggatggagtaccgggggcagcaggaccactcc
                                M  E  Y  R  G  Q  Q  D  H  S
gtcgacgagtacggcgacccggtggctgtgcacggaagcatgggagcgcgctccgccgcc
 V  D  E  Y  G  D  P  V  A  V  H  G  S  M  G  A  R  S  A  A
ggggcgttcacgggcgccggcgggcagctccagcacggcacggaggagcgtaaaaccggc
 G  A  F  T  G  A  G  G  Q  L  Q  H  G  T  E  E  R  K  T  G
gggatactgcgtcgctccggcagctccagctcggtgcggttttgacctctgtgttttata
 G  I  L  R  R  S  G  S  S  S  S
gacatatgcgcatcttcggcctgtacgtctttgccagctgtttatttccgttacgtgctt
gcagtctgctgaggatgacggcatgggcgggaggagggagaagggcgtgaaggagaaggtc
       S  A  E  D  D  G  M  G  G  R  R  E  K  G  V  K  E  K  V
aaggagaagctccccggtgggcagcacatggccgcgggaactggagctggcggggcttac
 K  E  K  L  P  G  G  Q  H  M  A  A  G  T  G  A  G  G  A  Y
gggcagcacacggccgcgggaactgggggccggcggagactacgggcagcaagggaacgca
 G  Q  H  T  A  A  G  T  G  A  G  G  D  Y  G  Q  Q  G  N  A
ggaatggccggcgaggagaagggagtcgtggacaagatcaaggagaagctgcccggacag
 G  M  A  G  E  E  K  G  V  V  D  K  I  K  E  K  L  P  G  Q
cactgagctaccggccccggctggctgtccgctgcttactactagtcgtcaagctcgagc
 H  -
tgaataaataagatgcccgcgatc
```

```
E10P10002F    TCCAACAGCAAACTCAACAGAGGTGATTGGATG

A2P4802Rrc    GTCGATGAGTACGGCGACCCGGTGGCTGTGCACGGAAGCATGGAGCGCGCTACGCCGCC 221
                                                                         Ser-Tyr!

E10P6102Rrc   GTCGATGAGTACAGCGACCCGGTGGCTGTGCACGGAAGCATGGGAGCGCGCTCCGCCGCC 218
                          Gly-Ser!
```

Dhn13 (LUX)

```
ggcccctcgccgatctataaataccggcgaagacgagccaagcaagatcaacaccatcatccc
atcccattagcgtcctactattcgccattttcctcggagagaagtagggacagcaccatggcc
ggcatcatccacaagatcgaggagaagctccacatgggcggcagcagcgacgag
 M  A  G  I  I  H  K  I  E  E  K  L  H  M  G  G  S  S  D  E
cacaagaaggatgacgagcacaagaaggcggaggagcacaagaagaaggacggcgagcac
 H  K  K  D  D  E  H  K  K  A  E  E  H  K  K  K  D  G  E  H
aagaaggacggggagcacaaggagggcatgatggagaagatcaaggacaagatcagcggc
 K  K  D  G  E  H  K  E  G  M  M  E  K  I  K  D  K  I  S  G
gacggccacggcgacggcaagaaggacggcgaccacaaggagaagaaggagaagaaggac
 D  G  H  G  D  G  K  K  D  G  D  H  K  E  K  K  E  K  K  D
aagaagaagaagaaggacaagaaggacggcgagggccacaaggacgacgacggccacagc
 K  K  K  K  K  D  K  K  D  G  E  G  H  K  D  D  D  G  H  S
Agcagcagcagcgacagcgactgagcgacctccggcgcgctccggcggcgtgcaggtgca
 S  S  S  S  D  S  D  -
```

```
LUX-F11-F    GCGGCAGCAGCGACGAGCACAAGAAGAATGACGAGCACAAG
                                       Asp-Asn!
LUX-A12-F    TGAGCGACCTCCGGCCGCGCTCCGGCGGCGTGCAAGTGCAG
```

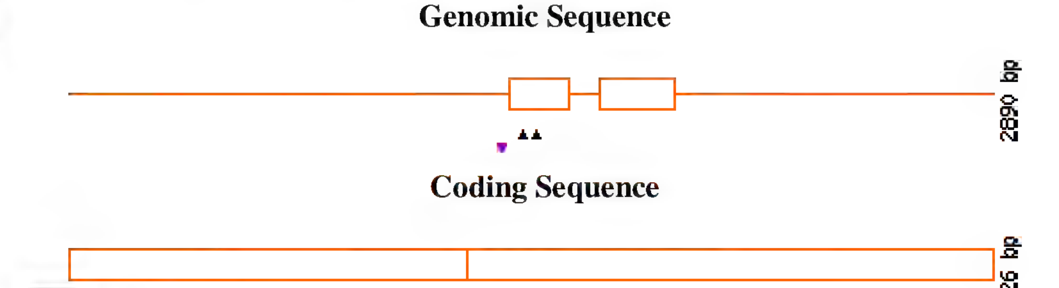
شكل 32: يظهر الطفرات الخمسة عند مورثتي الديهيدرين *Dhn12* و *Dhn13* وأماكن توضعها ضمن التتالي النكليوتيدي للمورثتين، كما يظهر الشكل نوع الطفرات الخمسة والتبدلات في الحموض الأمينية الناتجة عن هذه الطفرات. (A) الطفرات الثلاثة عند مورثة الديهيدرين *Dhn12* و (B) يظهر الطفرتين المكتشفتين عند مورثة الديهيدرين *Dhn13*.

3.7.2.4. تحليل الطفرات الناتجة عند المورثتين *Dhn12* و *Dhn13*

Analysis of detected mutations of *Dhn12* and *Dhn13*

تم بعد ذلك تحليل نتائج التتابع النكليوتيدي للطفرات الخمسة ضمن برنامج حاسوبي يدعى PARSNER. يعمل هذا البرنامج على إظهار مواقع الطفرات ضمن التتالي النكليوتيدي لقطعة الـــDNA أو المورثة الهدف المدروسة، كما يقوم بتحديد مواقع القص الأنزيمي المكتسبة أو المحذوفة (حساب توضع الطفرة) نتيجة حدوث الطفرة ومقارنةً مع التتالي النكليوتيدي للقطعة الـــDNA أو المورثة التابعة للنبات الأصل غير المطفر، (شكل 33).

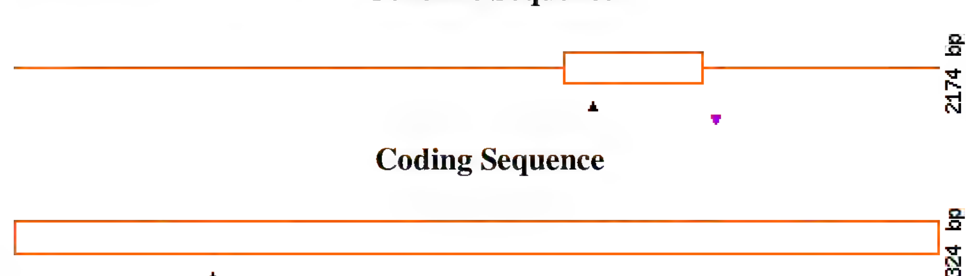
PARSESNP output of *Dhn12* gene



#	View On Sequence	Nucleotide Change	Effect	Restriction Enyzme Differences from REBASE		Description	Zygosity
				Gained in Variant	Lost from Reference		
1	G	G1353A	Non-coding	MmeI	BbvI, Fnu4HI, NspBII, TseI	E10P10002F	Homo
2	G C	G1421A	G15S	TatI	BcefI	E10P6102R	Homo
3	G C	C1461A	S28Y		AciI, BsiYI, EciI	A02P4802R	Homo

c





d

#	View On Sequence	Nucleotide Change	Effect	Restriction Enyzme Differences from REBASE		Description	Zygosity
				Gained in Variant	Lost from Reference		
1	G C	G1360A	D24N	MboII	FokI	F11P09801F	Homo
2	G	G1646A	Non-coding		AarI, BsgI, BspMI	A12P04101F	Homo

شكل 33: يظهر الشكل نتائج تحليل التتابع النكليوتيدي للطفرات الثلاث المحددة عند مورثتي الديهيدرين *Dhn12* و*Dhn13* وذلك بعد تحميل البيانات الخاصة بالطفرات المكتشفة لمورثتي الديهيدرين وعند جماعة الشعير Lux ضمن برنامج PARSESNP. ينتج عن هذا البرنامج رسوم بيانية وجداول خاصة ببيانات كل مورثة مدخلة، يظهر على الرسمين البيانيين (a) و(c) خريطة ومواقع الطفرات الثلاثة المكتشفة عند مورثة الديهيدرين *Dhn12* ومواقع الطفرتين المكتشفتين عند مورثة الديهيدرين *Dhn13* حيث مُثلت مناطق الاكسونات على شكل صناديق مغلقـــة ومناطق الانترونات على شكل خطوط مستقيمة. كما تظهر الجداول (b) و(d) معلومات عـــن تأثير الطفرات الخمسة المكتشفة (المحدثة) ضمن المورثتين المدروستين على التغير في المواقع الأنزيمية المشمولة بمناطق هذه الطفرات، إذ يؤدي حدوث تغير في التتالي النكليوتيدي إلى كسب أو خسارة مواقع قص أنزيمية في المناطق الحاصل بها الطفرات حســـب مكان ونوع الطفرة المحدثـــة والتي يمكن الاستفادة منها لاحقاً في عمليات التوصيـــف الوراثي Genotyping. كما تظهر الجدول تأثير التغيرات أو التبدلات النكليوتيدية على الحموض الأمينية. تشير الأسهم ذات اللون الوردي إلى التغيرات النكليوتيدية (الطفرات) خارج مناطق التشفير، في حين تشير الأسهم السوداء إلى

التغيرات النكليوتيدية (الطفرات) ضمن مناطق التشفير التي تؤثر في تركيب البروتين، (Taylor and Greene 2003, http://www.proweb.org/parsesnp/).

هذا ويشير تحليل نتائج التتابع النكليوتيدي للطفرات الخمسة المكتشفة (ثلاثة طفرات عند مورثة الديهيدرين *Dhn12* واثنتان عند مورثة الديهيدرين *Dhn13*)، وبعد مقارنة التتابع النكليوتيدي لقطع الـــDNA المحتوية على هذه الطفرات مع التتابع النكليوتيـــدي للمورثتين *Dhn12* و *Dhn13* للصنف Lux غيـــر المطفر (والذي يسمى بالنمط البري wild type) بأن ثلاثة طفرات من أصل خمسة كانت ضمن مناطق التشفير coding region، وجميعها من نمط طفرات Missense، إذ نتج عنها تغير في الحموض الأمينية المشاركة في تشفيرها. كانت إثنتان من هذه الطفرات ناتجة عن التبدل G/C إلى A/T، أما الطفرة الثالثة فقد كانت من نوع التبدل C/G إلى A/T. أما الطفرتان الرابعة والخامسة فقد كانتا في المناطق غير المشفرة non-coding region (إحداهما كانت قبل شيفر البدء عند المورثة *Dhn12* والأخرى بعد شيفرة التوقف عند المورثة *Dhn13*)، وكلتاهما كانتا من نوع التبدل G/C إلى A/T.

4.7.2.4. معدل الطفرات الناتجة عند جماعة الشعير Lux

Mutation rate of Lux barley population

إن الطفرات الخمسة المكتشفة عند المورثتين المدروستين هنا تعطي كثافة طفرات mutation density أو تكرار طفرات بمعدل طفرة واحدة كل 2.5 مليون شفع قاعدي أو نكليوتيدي، أو يمكن القول أنه يوجد حوالي 2000 طفرة لكل مجموع وراثي genome لصنف الشعير Lux لكل بذرة على اعتبار أن حجم المجموع الوراثي لنبات الشعير 5000 - 5300 ميغا شفع نكليوتيدي (5000-5300 Mbp). (تم حساب تكرار الطفرات من خلال حجم قطعة الـــDNA أو المورثة المدروسة، فحجم قطعة الـــDNA المدروسة هنا بالنسبة للمورثة *Dhn12* هو 745 شفع نكليوتيدي، وبالنسبة للمورثة *Dhn13* هو 544 شفع نكليوتيدي ومجموعهما هو 1289 شفع نكليوتيدي تمت غربلتها ضمن 9515 عينة، مع الأخذ

بالاعتبار أن 60 عينة من أصل 9575 لم تنتش بذورها، راجع فقرة 1.1.4.)، أي تمت غربلة 9515x1289 = 5/12264835 طفرات = 2452967

أي طفرة كل 2452967 (2.4 Mbp) شفع قاعدي أو نكليوتيدي.

إن الطفرات الناتجة عند المورثتين المدروستين كانت جميعها من نمط missense (missense mutations) وكانت من نمط تبدل G/C أوC/G إلى A/T كما هو متوقع بالنسبة للطفرات الناتجة عند المعاملة بمادة أزيد الصوديوم المُطفرة (Taylor and Greene, 2003 وTalame` et al. 2008). كان تكرار الطفرات mutation frequency ضمن هاتين المورثتين أقل من تكرار الطفرات عند كلٍ من جماعتي الشعير (Optic وMorex) المطفرتين في الدراسات الأخرى بهدف تطبيق تقانة الـTILLING عليهما، إذ كان تكرار الطفرات عند جماعة الشعير Optic (*Hordeum vulgare* L. cv. 'Optic') طفرة واحدة كل 1 ميغا (مليون) شفع قاعدي أو نكليوتيدي (Caldwell et al., 2004)، أما عند جماعة الشعير الأخرى Morex (*Hordeum vulgare* L. cv. 'Morex') فقد كان تكرار الطفرات طفرة واحدة كل 374 ألف شفع قاعدي أو نكليوتيدي (Talame` et al. 2008). قد يكون مرد هذا الاختلاف في تكرار الطفرات عند جماعة الشعير Lux وجماعتي الشعير Optic وMorex هو اختلاف المادة الكيميائية المستخدمة لتطفير جماعة الشعير Optic (مادة EMS) أو اختلاف تركيز مادة أزيد الصوديوم المستخدمة لتطفير جماعة الشعير Morex (استخدام تركيز أعلى من ذلك المستخدم مع جماعة الشعير Lux)، أو باختلاف المورثات المدروسة، ومع ذلك كانت دراسة أولية قد تم إجرائها في هذا البحث على معدل الطفرات النقطية عند جماعة الشعير Lux المطفرة بغربلة 4000 عينة من أفرادها مع كلٍ من المورثتين *Dhn3* و*Dhn8* قد أظهرت أن معدل الطفرات عند هاتين المورثتين كان طفرة كل 0.6 مليون شفع قاعدي أو نكليوتيدي عند المورثة الأولى *Dhn3* وطفرة كل 1.4 مليون شفع قاعدي عند المورثة الثانية *Dhn8*. بشكل عام كان معدل الطفرات عند مورثات الديهيدرين هو طفرة كل 1.5 مليـــون شفع قاعدي، يعطـــي هذا التكرار ما مجموعه 25 طفرة (نظير مختلف عن الصنف غير المطفر) عند جماعة الشعير Lux وضمن قطعة DNA أو مورثة بحجم 1500 شفع قاعدي أو نكليوتيدي. إن تكرار الطفرات هذا قابل

للمقارنة مع جماعات الشعير الأخرى المطفرة بهدف تقانة الـــTILLING فقد اختلف معدل الطفرات عند جماعـــة الشعيـــر Optic المذكورة من 1 وحتى 1.4 طفـــرة لكل 1 مليون شفع قاعدي، في حين كان معـــدل الطفرات عند جماعة الشعير Brake المطفرة وضمن خمسة مورثات مدروسة متراوحاً من طفرة واحدة لكل 200 ألف شفع نكليوتيدي إلى طفرة كل 870 ألف شفع نكليوتيدي، وبمعدل عام طفرة واحدة كل 480 ألف شفـــع نكليوتيدي (Gottwald et al., 2009). أما عند الجماعات النباتية الأخرى المطفرة بهدف تطبيق تقانة الـــTILLING عليها فقد كان معدل الطفرات مختلفاً بشكل كبير، فعند جماعة الرز المطفرة IR64 كان تكرار الطفرات 1 طفرة كل 1 مليون شفع قاعدي (Caldwell et al., 2004 وWu et al., 2005)، ولكنه أقل من تكرار الطفرات عند كل من جماعة الـــ*Arabidopsis* (*Landsberg erecta*) (1 طفرة كل 300 ألف شفع قاعدي) وطفرة كل 89 ألف شفع نكيوتيـــدي عند جماعـــة الـــ*Arabidopsis* (Columbia) (Martín et al., 2009)، وكان عند جماعة نبات اللوتس Lotus (1 طفرة كل 154 ألف شفع قاعدي، Perry et al., 2009) وعند جماعتي القمح المطفرتين (1 طفرة كل 22 ألف شفع قاعدي)، (Perry et al. 2003 وSlade et al. 2005)، أما عند جماعة القمح Kronos، فقد كان معدل الطفرات طفرة كل 70 ألف شفع قاعدي، في حين كان معدل الطفرات عند جماعة القمح من الصنف Hard Red Spring طفرة واحدة كل 70 ألف شفع قاعدي (Uauy et al., 2009)، وكان معـــدل الطفرات عند جماعـــة نبات الـــ*Medicago truncatula* طفرة كل 400 ألف شفـــع نكليوتيدي (Porceddu et al., 2008)، وطفـــرة واحـــدة كل 103 ألف شفع نكليوتيدي عند جماعة الضفادع المطفرة باستخدام مادة N-nitroso-N-ethyl-urea ENU (Goda et al., 2006)، وطفرة كل 526 ألف شفع قاعدي عند جماعة الـــSorghum المطفرة (Xin et al., 2008)، وطفـــرة كل 293 ألف شفـــع قاعدي عنـــد جماعة الديدان *C. elegans* (Gilchrist et al., 2006)، وطفرة كل 140 -550 ألف شفع نكليوتيدي عند نبات فـــول الصـــويا Soybean (Cooper et al., 2008a و Lightfoot, 2008 وDierking and Bilyeu, 2009 وDierking and Bilyeu, 2008).

هذا ومن الدراسات السابقة الذكر وجد الباحثون أن معدل الطفرات النقطية المحدثة يختلف بشكل كبير بين وضمن الجماعات النباتية المطفرة، وذلك وفق ثلاثة معايير أساسية، فحسب المعيار الأول، يختلف معدل التطفير تبعاً لنوعية المطفر المستخدم (EMS، أزيد الصوديوم، ENU). أما المعيار الثاني فيرد إلى النوع النباتي المطفر، وحتى تحت النوع أوالصنف االمستخدم. وأخيراً وضمن المعيار الثالث، قد يختلف معدل الطفرات ضمن نفس الجماعة المطفرة تبعاً لمناطق الـــDNA المختلفة (وبالنتيجة تبعاً للمورثة أو المورثات المدروسة)، هذا ويدعم تلك الاستنتاجات دراسة حديثة أجريت على جماعة البندورة Red Setter (Minoia et al, 2010)، فقد أظهرت نتائج تلك الدراسة اختلافات كبيرة في معدل الطفرات الناتجة وذلك تبعاً للمورثة المدروسة وتبعاً لتركيز مادة الـــEMS المطفرة فقد تراوحت هذه النسبة من طفرة كل 97 ألف شفع نكليوتيدي وحتى طفرة كل مليون و293 ألف شفع نكليوتيدي. يظهر كلاً من الجدولين (4 و5) مقارنة بين الجماعات العالمية المطفرة بهدف استخدامها في تقانة الـــTILLING.

8.2.4. تحليل تغيرات الحموض الأمينية الناتجة عن الطفرات المكتشفة

Analysis of amino acid changes resulted form the detected mutation

تم تحليل نتائج الطفرات باستخدام برنامج SIFT وهو برنامج يعتمد على مقارنة التبدلات النكليوتيدية (في حال حدوثها) مع معلومات البنوك الوراثية وتنبؤ فيما إذا كانت هذه التبدلات سوف تؤثر على طبيعة البروتين الناتج عن التغير في الحموض الأمينية نتيجة الطفرات المحدثة، وبالتالي إذا كانت هذه التبدلات سوف تعكس تغيراً في النمط الشكلي أو الوظيفي للموثة أو لا. أظهرت نتائج هذا التحليل أن الطفرات الثلاثة المكتشفة عند مورثتي الديهيدرين *Dhn12* و*Dhn13* والتي أدت إلى تبدل الحموض الأمينية الثلاثة المسؤولة عنها ستكون مؤثرة على بنية ووظيفة المورثات المسؤلة عنها (اي مورثتي الديهيدرين *Dhn12* و*Dhn13*)

استخدم برنامج SIFT عند عدد كبير من الدراسات التي أجريت على الجماعات المطفرة مشمولةً بالدراسات التي أجريت بهدف كشف التباينات الطبيعية بتطبيق تقانة

الـــEcoTILLING، فقــد استخدم هــذا البرنامج عند دراســـة وكشف الطفرات عند جماعات القمح (Slade et al., 2005 وUauy et al., 2009)، وجماعة البندورة المطفرة (Minoia et al., 2010)، وجماعة الـــSorghum المطفرة (Xin et al., 2008)، وجماعة الذرة (Till et al., 2004a)، وجماعة الـــ*Arabidopsis* (Till et al., 2003a)، وكذلك لدى الدراسة التي أجريت لكشف الطفرات الطبيعية بتطبيق تقانة الـــEcoTILLING عند النبات (Coassin et al., 2008)، والإنسان (Till et al., 2006).

جدول (4): يبين مقارنة الجماعات العالمية المطفرة باستخدام المطفرات المعيارية المتخدمة في تقانة الــTILLING ومعدل لطفرات الناتجة عن هذه المعاملة:

المتعضية المطفرة	النوع	المطفر	جرعة التطفير	حجم المجموع الوراثي التقريبي	التعدد الصبغي	معدل الطفرات المسجل	المرجع
Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	EMS	20-40 mM	125 Mb	2X	1/300 kb	Greene et al., 2003
Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	EMS	20-40 mM	125 Mb	2X	1/51-114 kb	Martín et al., 2009
Barley	*Hordeum vulgare*	EMS	20-30 mM	5.300 Mb	2X	1/Mb	Caldwell et al., 2004
Barley	*Hordeum vulgare*	NaN_3	-	5.300 Mb	2X	1/374 kb	Talame` et al. 2008
Barley	*Hordeum vulgare*	EMS	20-60 mM	5.300 Mb	2X	1/480 kb	Gottwald et al., 2009
Barley	*Hordeum vulgare*	NaN_3	1.5 mM	5.300 Mb	2X	0.66/Mb	Lababidi et al., 2009
Maize	*Zea mays*	EMS	0.0625%	2.500 Mb	2X	0.93/kb B73	Weil and Monde, 2007
Maize	*Zea mays*	EMS	0.0625%	2.500 Mb	2X	2.10/kb W22	Weil and Monde, 2007
Maize	*Zea mays*	EMS	1%	2.500 Mb	2X	2/Mb	Till et al., 2004
Rice	*Oryza sativa*	EMS	1.5%	430 Mb	2X	1/294 kb	Till et al., 2007
Rice	*Oryza sativa*	Az-MNU	1mM Az 15nM MNU	430 Mb	2X	1/265 kb	Till et al., 2007
Rice	*Oryza sativa*	EMS	0.8-1%	430 Mb	2X	0.5/Mb	Wu et al., 2005
Rice	*Oryza sativa*	EMS	1.6%	430 Mb	2X	1/Mb	Wu et al., 2005
Soybean	*Glycine max*	NMU	2.5 mM	1.115 Mb	2X	1/140 kb	Copper et al., 2008a
Soybean	*Glycine max*	EMS	50 mM	1.115 Mb	2X	1/250 kb	Copper et al., 2008a
Soybean	*Glycine max*	EMS	40 mM	1.115 Mb	2X	1/550 kb	Copper et al., 2008a

المرجع	معدل الطفرات المسجل	التعدد الصبغي	حجم المجموع الوراثي التقريبي	جرعة التطفير	المطفر	النوع	المتعضية المطفرة
Slade et al., 2005	1/40 kb	4X	12.000 Mb	0.75-1%	EMS	*Triticum aestivum Subsp. durum*	Wheat
Slade et al., 2005	1/24 kb	6X	17.000 Mb	0.75-1.2%	EMS	*Triticum aestivum*	Wheat
Uauy et al, 2009	1/70 kb	4X	12.000 Mb	57-60 mM	EMS	*Triticum turgidum L. subsp. durum*	Wheat
Uauy et al, 2009	1/59 kb	6X	17.000 Mb	73-80 mM	EMS	*Triticum aestivum*	Wheat
Xin et al., 2008	1/526 kb	2X	735 Mb	0.1-0.3%	EMS	*Sorghum bicolor*	Sorghum
Winkler et al., 2005	1/156 kb	2X	180 Mb	50 mM	EMS	*Drosophila melanogaster*	Fruit fly
Winkler et al., 2005	1/90.5 kb	2X	180 Mb	125 mM	EMS	*Drosophila melanogaster*	Fruit fly
Bentley et al., 2000	1/209 kb	2X	180 Mb	50 mM	EMS	*Drosophila melanogaster*	Fruit fly
Copper et al., 2008b	1/180 kb	2X	180 Mb	25 mM	EMS	*Drosophila melanogaster*	Fruit fly
Gilchrist et al., 2006	1/293 kb	2X	100 Mb	25 mM	EMS	*C. elegans*	Nematode
Wienholds et al., 2003	1/235 kb	2X	1.700 Mb	3.0 mM	ENU	*Danio rerio*	Zebrafish
Perry et al., 2009	1/154	2X	472 Mb	0.6%	EMS	*Lotus japonicus*	Lotus
Minoia et al., 2010	1/322-574 kb	2x	950 Mb	0.7-1%	EMS	*Solanum lycopersicum*	Tomato
Triques et al., 2007	1/669 kb	2X	4.300 Mb	4mM	EMS	*Pisum sativum*	Pea
Porceddu et al., 2008	1/400 kb	2x	450-530 Mb	0.15%	EMS	*Medicago truncatula*	Medicago

جدول (5): يبين مقارنة الجماعات العالمية المطفرة من حيث عدد المورثات المدوسة عند كل جماعة ونوع الطفرات المحدثة وعددها.

المرجع	المجموع	طفرات Non Coding	طفرات الإزاحة	طفرات Nonsense	طفرات Missense	الطفرات الصامتة	عدد المورثات المدروسة	الجنس
Greene et al., 2003	1.890	--	--	93	946	851	192	Arabidopsis
Martín et al., 2009	450	--	--	23	207	212	14	Arabidopsis
Caldwell et al., 2004	10	--	0	0	6	4	2	Barley
Gottwald et al., 2009	81	17	--	3	29	35	6	Barley
Lababidi et al., 2009	5	2	0	0	3	0	2	Barley
Slade et al., 2005	246	--	5	3	84	--	3	Wheat
Uauy et al, 2009	186	2	2	6	74	--	4	Wheat (hexa)
Uauy et al, 2009	93	--	--	5	26	--	4	Wheat (tetra)
Perry et al., 2003	15	--	1	--	6	--	1	Lotus
Horst et al., 2007	57	19	0	2	28	8	4	Lotus
Perry et al., 2009	576	163	4	16	275	118	61	Lotus
Till et al., 2004a	17	--	0	0	10	7	11	Maize
Xin et al., 2008	5	2	0	0	3	0	4	Sorghum
Triques et al., 2007	60	--	0	2	39	19	5	Pea
Till et al., 2007	57	8	--	1	29	19	10	Rice
Cooper et al., 2008	116	9	0	3	62	42	7	Soybean
Porceddu et al., 2008	15	--	--	0	9	6	2	Medicago
Minoia et al., 2010	66	--	--	0	41	25	7	Tomato
Winkler et al., 2005	44	--	0	1	33	10	3	Fruit fly
Bentley et al., 2000	16	4	0	0	6	6	1	Fruit fly
Copper et al., 2008b	1887	--	--	57	1000	1830	132	Fruit fly
Gilchrist et al., 2006	71	--	0	2	42	27	10	Nematode
Wienholds et al., 2003	255	52	7	14	119	63	16	Zebrafish
Goda et al., 2006	27	--	1	5	15	6	6	Frog

5. الاستنتاجات Conclusions

يمكن القول بشكل عام أن تقانة الــTILLING أحرزت تقدماً كبيراً في مجال الدراسات الوراثية العكسية ودراسة وظيفة المورثات، فهي تملك ميزات متقدمة على التقانات الأخرى المستخدمة في مجال الدراسات الوراثية العكسية، إذ أنها لا تتطلب تقانات نقل مورثي أو RNAi، كما يمكن تطبيقها على العديد من الكائنات، وقد تم تطبيق هذه التقانة على جماعة الشعير Lux، ويمكن تلخيص أبرز الاستنتاجات التي حصلنا عليها في هذا البحث في النقاط التالية:

1. أظهرت نتائج التسجيل عند جماعة الشعير Lux المطفرة أن تكرار طفرات اليخضور كان مشابهاً لجماعات الشعير المطفرة الأخرى، كما تم تسجيل 58 طفرة في الجذور استخدمت كمعيار أيضاً في تقدير نجاح عملية التطفير باستخدام مادة أزيد الصوديوم عند هذه الجماعة.
2. تم في هذا البحث اعتماد استرتيجية عمل لعزل الــDNA من أفراد الجماعة النباتية المطفرة (9575 فرد) وذلك من خلال تقسيم الجماعة النباتية إلى خمس مجموعات وإجراء بعض التعديلات على طريقة الاستخلاص المتبعة (CTAB method)، وقد كانت هذه الاستراتيجية مهمة ومؤثرة في توفير الوقت والكلفة اللازمان لعزل الــDNA من جماعة نباتية كبيرة العدد كتلك المستخدمة في دراسة الطفرات المحدثة.
3. تم تحضير وتنقية أنزيم Cel I الضروري لمرحلة كشف التباينات النكليوتيدية (قص مناطق عدم المطابقة ضمن قطع الــDNA ذات الازدواج غير المتجانس) ضمن مراحل تقانة الــTILLING من نبات الكرفس celery باستخدام عدة أعمدة فصل لتنقيته، وقد كانت هذه الطريقة فعّالة في تحضير هذا الأنزيم المماثل في خواصه وجودته لذلك المحضر في الشركات المختصة مما وفر الكلفة المرتفعة لشراء هذا الأنزيم.
4. تعتبر نسبة المزج في مرحلة الكشف عن التباينات النكليوتيدية عند تقانة الــTILLING مسألة ذات فعالية لتشكيل عرى بين شريطي الــDNA ولتمييز مناطق عدم المطابقة للمنطقة الهدف من الــDNA أو المورثة المدروسة، وإنه من المهم هنا خلق توازن بين

زيادة نسبة المزج (عدد عينات الــDNA الممزوجة معاً) مع الابقاء على حساسية الكشف عن الطفرات ممكناً، فزيادة نسبة المزج يوفر الوقت والكلفة اللازمان للتعامل مع عينات الجماعة النباتية ولكنها بنفس الوقت قد تضعف حساسية كشف الطفرات ضمن المزيج (إن وجدت). من النتائج المهمة والمؤثرة في هذا البحث هي الوصول إلى نسبة مزج لعينات الــDNA حتى 10 عينات مما زاد في كفاءة استخدام الكشف عن الطفرات ضمن أفراد جماعة الشعير المطفرة Lux، وهي المرة الأولى التي تستخدم فيها نسبة مزج 10 مرات ضمن جماعات النبات والحيوان العالمية المطفرة بهدف تطبيق تقانة الــTILLING عليها.

5. قد تكون واحدة من الأسباب التي مكّنت من الوصول إلى نسبة مزج فعّالة (10 عينات DNA) هي نظام البادئات المعلمة بالفلورة (6-Fam and Vic) المستخدمة في تفاعل الــPCR، وكذلك استخدام نظام جهاز الرحلان الكهربائي ABI PRISM 377 DNA Sequencer.
6. إن غربلة كامل أفراد جماعة الشعير Lux المطفرة مع اثنتين من مورثات الديهيدرين الــ13 المعروفة عند الشعير وهما *Dhn12* و*Dhn13* مكّن من تقصي فائدة استخدام تقانة الــTILLING كتقانة عالية الكفاءة في كشف الطفرات، وكذلك قابلية استخدام جماعة الشعير Lux المطفرة في تقانة الــTILLING لدراسة وظيفة العديد من المورثات والصفات المهمة عند نبات الشعير.
7. تم اختيار مورثات الديهيدرين لهذا الهدف كون أن التتالي النكليوتيدي لها معروف ومتاح ضمن بنوك المورثات، ولأن هذه المورثات معروفة بمسؤليتها عن مقاومة ظروف الإجهاد اللاحيائية (up-regulated by abiotic stress conditions) مثل الجفاف والبرودة والملوحة عند النباتات، إذ أن الحصول على نظائر مختلفة من هذه المورثات (عن طريق الأفراد المطفرة بهدف تقانة الــTILLING هنا في هذ البحث)، سوف يمكّن مستقبلاً من دراسة وظائفها وتأثيرها على مقاومة الظروف اللاحيائية المذكورة بشكل عام والجفاف بشكل خاص، كما يمكن استخدام الأفراد التي تحتوي على هذه النظائر من مورثات الديهيدرين لاحقاً في برامج التربية النباتية.

8. لقد تم في هذا البحث اختبار العديد من ظروف العمل فيما يخص مراحل كشف الطفرات المحدثة وكذلك عدد من الأدوات والطرائق المختلفة بهدف زيادة كفاءة كشف الطفرات المحدثة ضمن مراحل تقانة الـــTILLING (مثل استرتيجية عزل الـــDNA من أفراد جماعة نباتية كبيرة العدد، والوصول إلى نسبة مزج 10، وتطبيق تقانة الكشف عن قطع القص الناتجة عن الطفرات المحدثة باستخدام جهاز رحلان ABI PRISM 377 DNA Sequencer)، وقد ساهمت هذه التعديلات والتغيرات في جعل العمل على هذه الجماعة أكثر سهولة وفاعلية، فقد زادت كفاءة العمل وقللت من الجهد المبذول لكشف الطفرات عند المورثات المدروسة في هذا البحث والمورثات المراد دراستها لاحقاً باستخدام جماعة الشعير Lux.
9. إن الطفرات الناتجة عند المورثتين المدروستين كانت جميعها من نمط missense (missense mutations) وكانت من نمط تبدل G/C أوC/G إلى A/T كما هو متوقع بالنسبة للطفرات الناتجة عند المعاملة بمادة أزيد الصوديوم المُطفرة.
10. إن الطفرات الخمسة المكتشفة عند المورثتين المدروستين هنا تعطي كثافة طفرات mutation density أو تكرار طفرات بمعدل طفرة واحدة كل 2.5 مليون شفع قاعدي أو نكليوتيدي، أو يمكن القول أنه يوجد حوالي 2000 طفرة لكل مجموع وراثي genome لصنف الشعير Lux لكل بذرة على اعتبار أن حجم المجموع الوراثي لنبات الشعير 5000 -5300 ميغا شفع نكليوتيدي (5000-5300 Mbp).
11. لقد تم لأول مرة في هذا البحث إثبات نجاح تطبيق عملية التطفير على جماعة الشعير Lux، وكذلك نجاح استخدام تقانة الـــTILLING على الجماعة المذكورة في تحديد الطفرات النقطية المحدثة، والتي تعد مهمة ليس فقط في أبحاث الوراثة العكسية لدراسة وظيفة المورثات ولكن في برامج التربية أيضاً باستخدام النظائر المكتشفة للمورثات المدروسة.

6. المقترحات والتوصيات

Suggestions & Recommendations

1. أظهرت النتائج في هذا البحث نجاح عملية التطفير التي تم إجراها على الصنف Lux باستخدام مادة أزيد الصوديوم، لذلك يوصى باعتبار هذه الجماعة كجماعة مطفرة معيارية عند نبات الشعير واستخدامها ضمن تقانة الـــTILLING لدراسة المورثات المهمة عند نبات الشعير والمفيدة في الأبحاث الوراثية الجزيئية وأبحاث التربية.
2. أظهرت النتائج أن ثلاثة طفرات من الطفرات الخمسة المكتشفة عند جماعة الشعير Lux ضمن مورثتي الديهيدرين *Dhn12* و*Dhn13* قد غيرت في الحموض الأمينية الناتجة عن ترجمة مواقع هذه الطفرات ضمن المورثات، كما أظهرت نتائج توقع أضرار هذه الطفرات على البروتينات الناتجة أنها ايجابية، لذلك ينصح باستكمال دراسة الأفراد النباتية الثلاثة التي تحتوي على هذه الطفرات حقلياً ودراسة التغيرات الشكلية والفيزيولوجية المحتملة.
3. لدى دراسة الأفراد االنباتية التي تحتوي على الطفرات الثلاثة المكتشفة، يوصى بإجراء عدد من التهجينات العكسية أو الراجعة للأفراد الثلاثة مع الأب Lux غير المطفر، وذلك بهدف تخفيض العدد الكلي للطفرات المحدثة ضمن كل فرد والناتجة عن المعاملة بالمادة المطفرة.
4. كانت التعديلات التي تم تطبيقها على خطوات استخلاص الـــDNA مؤثرة وذات فعالية عالية الأداء في عزل الـــDNA لعدد كبير من العينات النباتية، إذ كان مكّنت من عزل الـــDNA بمعدل 400 عينة يومياً، لذلك يوصى بتطبيق تلك التعديلات على جميع الجماعات النباتية ذات العدد الكبير المراد عزل الـــDNA من عيناتها سواءً كانت تلك الجماعات مطفرة أو غير مطفرة.
5. ينصح باستكمال الأبحاث لتحسين ظروف مراحل كشف التباينات النكليوتيدية عند جماعة الشعير Lux المطفرة، فعلى سبيل المثال تم في هذا البحث الوصول إلى نسبة مزج 10 (10 عينات DNA) وهي المرة الأولى التي يتم فيها استخدام هذه النسبة عند الجماعات المطفرة بهدف استخدامها في تقانة الـــTILLING، وقد أظهرت النتائج الأولية على جماعة الشعير Lux أنه يمكن تطبيق نسبة مزج حتى 12 أو16 عينة DNA معاً.

6. أظهرت النتائج أن معدل الطفرات المحدثة عند جماعة الشعير Lux كان منخفضاً نوعاً ما مقارنةً مع معدل الطفرات عند بقية المحاصيل كالقمح والـ*Arabidopsis*، وهي مقاربة لتلك التي تم الحصول عليها عند جماعات الشعير العالمية المطفرة، إذ أظهرت الأبحاث أن معدل الطفرات المحدثة عند نبات الشعير بشكل عام هي منخفضة، لذلك قد يكون من المفيد استخدام نظام التطفير على دفعتين وذلك بتطفير جماعة الشعير Lux مرة ثانية سواءً بمادة أزيد الصوديوم أو مادة EMS.

7. Summary

The knowledge in the field of molecular biology during the last two decades has increased enormously and important progress in studying gene structures and functions has been achieved. Ample information on the genome sequences is now available in particular from model species such as rice and *Arabidopsis*, but the functions of the predicted genes are largely unknown. Therefore, to fill the gap between the structure and function of genes, many reverse genetic techniques have been developed. Induced mutations with molecular marker technology are now playing an important role in this field, leading to a firmed up demand for mutagenized plant material in which certain characters have been changed due to knockout mutations of the responsible genes. Using molecular and genetic tools, a mutated character can then be associated with a DNA sequence of previously unknown function. TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) is a reverse genetic strategy that allows rapid mutational screening to discover induced lesions in a gene of interest. TILLING is based on a PCR screening within known sequences region of interest for variants of heteroduplex analysis or mismatch cleavage to detect mutations. The use of chemical mutagens allows generating an allelic series at the DNA level, resulting in a change of function, reduced activity or specificity or a knockout mutation

In this study, A TILLING population has been developed for the Danish barley variety 'Lux' (*Hordeum vulgare* L.), by using sodium azide to induce mutations. Four visible phenotypic characters of barley seedling in reference to the parental cultivar 'Lux' in the M_3 plants were scored. Cel I enzyme was isolated and purified from celery and the activity of the extracted enzyme was tested. DNA concentration and dilution ratio for PCR amplification of target gene/genes were determined. A series of pool ratios of mixed DNA from two DNA samples (one sample from Lux variety and the other from one of Syrian barley entries from ICARDA Genebank) were tested in this study on *Dhn8* gene. LI-COR sequencers are being widely used to detect point mutation in TILLING populations, DHPLC used also for this purpose. ABI PRISM *377* DNA Sequencer was tested for heteroduplex analysis (mismatch cleavage) to detect point mutations. Two of the 13 known dehydrin genes, *Dhn12* and *Dhn13*,

respectively, were applied on 'Lux' population to test the mutation ratio of this population.
Previous studies on this population showed that the chlorophyll mutation frequency of the mutagenized population 'Lux' material was 7% of the M_1 progeny and 0.9% of M_2 seedlings. In the current study, four visible phenotypic characters of seedling (no growth, chlorophyll defects, dwarfs and necrotic spots on leaves) were scored and showed over 3.5% abnormal plant. Screening of pooling ratio experiments were performed using a different positive mixed-fold pooling ratio at the beginning (2, 4, 8, 10, 12), 10-fold pool appeared to be the practical ratio of detection by ABI PRISM *377* DNA Sequencer (Applied Biosystems) for fragments in the 500- to 800-bp range. Therefore high-throughput TILLING was performed on 10-fold pooled samples for the *Dhn12* and *Dhn13* genes.
9575 mutant lines were screened and pooled 10-fold in a 96-well format. Primers were designed to yield a 745 bp and a 544 bp product for *Dhn12* and *Dhn13*, respectively. PCR products were loaded on ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems), and showed three positive pools for *Dhn12* and two positive pools for *Dhn13*, respectively. These five positive pools were confirmed by screening the 10 individuals after mixing their DNA with Lux wild type DNA and using the Cel I method to find the individual mutant in the pool. A single plant was identified from each of determined pool by single pass sequence from both ends of each fragment. The results showed also that ABI PRISM 377 DNA Sequencer was effective instrument for detecting cut fragments of heteroduplex analysis.

In this study we could demonstrate the utility of the TILLING technique in the detection of induced point mutations in two dehydrin genes, *Dhn12* and *Dhn13* that might be of interest for a research programme on drought effects on plants. As we demonstrated the utility of the PRISM 377 DNA Sequencer as powerful tool for point mutation detection in TILLING populations. We have for the first time demonstrated the successful application of the barley cultivar 'Lux' population to detect mutations in target genes. Construction of TILLING populations in barley and successful application to detect mutations (allelic series of a gene) is not only important for the scientific community but also from a plant breeding perspective, and in particular for breeding for drought tolerance.

8. الأوراق العلمية المنشورة من هذا البحث

1. **السعيد و.، باوم م.، جهور أ.، ولبابيدي س.،** (2009). تحديد درجة المزج (Pooling) المثلى لعينات الـــDNA المستخدمة في تقانة الـــTIILLING عند الشعير. مجلة بحوث جامعة حلب، 2009 (قيد النشر)

2. **Lababidi S., Mejhede N., Rasmussen S. K., Backes G., Al-Said W., and Baum M.**, (2009).Identification of barley mutants in cultivar 'Lux' at the *Dhn* loci through TILLING. *Plant Breeding*; 128 (4): p332-336

3. **Al-Said W., Baum., Jahoor A. and Labbaidi S.**, (2007). Targeting Induced Local Lesions IN Genomes in Barley carried out on ABI PRISM 377 Sequencer, R. J. of Aleppo Uni.; 56: 23

9. المراجع الأجنبية

Achaz G, Netter P, Coissac E., (2001). Study of intrachromosomal duplications among the eukaryotic genomes. *Mol. Biol. Evol.* 18:2280-88

Allaby M., (1998). Mutation rate. In: A Dictionary of Plant Sciences: originally published by Oxford University Press 1998.

Aminetzach Y. T., Macpherson J. M., Petrov D. A., (2005). "Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in *Drosophila*". *Science*; 309 (5735): 764–776

Anonymous, (1977). Manual on mutation breeding, Second Edition, IAEA, *Tech. Rep. Ser.*; No. 119,. Vienna

Ashburner M., Misra S., Roote J., Lewis S. E., Blazej R., Davis T., Doyle C., Galle R., George R., Harris N., Hartzell G., Harvey D., Hong L., Houston K., Hoskins R., Johnson G., Martin C., Moshrefi A., Palazzolo M., Reese M G., Spradling A., Tsang G., Wan K., Whitelaw K., Celniker S., (1999). An exploration of the sequence of a 2.9-Mb region of the genome of *Drosophila* melanogaster: the *Adh* region. *Genetics*; 153:179-219

Ashburner M., (1990). *Drosophila*, A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press. 1133 pp.

Ausubel F. and Benfey P.N., (2002). *Arabidopsis* functional genomics. *Plant Physiology*; 129: 393

Bairoch A. and Apweiler R., (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.*; 28:45-48.

Barkley N. A. and M.L Wang M. L., (2008). Application of TILLING and EcoTILLING as Reverse Genetic Approaches to Elucidate the

Function of Genes in Plants and Animals. Curr Genomics; 9(4): 212–226.

Baulcombe D., (2002). RNA silencing. *Curr. Biol.*; 12: 82-84

Bechtold N. and Pelletier G., (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol. Biol.*; 82:259-66

Bentley A., MacLennan B., Calvo J., Dearolf C. R., (2000). Targeted recovery of mutations in *Drosophila*. *Genetics*; 156:1169-1173

Bertram J., (2000). "The molecular biology of cancer". *Mol. Aspects Med.*; 21 (6): 167–223.

Bray M. S., Boerwinkle E., Doris P. A., (2001). High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise. *Hum. Mutat.*; 17:296-304

Burrus V., Waldor M., (2004). "Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements". *Res. Microbiol.*; 155 (5): 376–386.

Caldwell D. G., McCallum N., Shaw P., Muehlbauer G. J., Marshall D. F., and Waugh R., (2004). A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J.*; 40: 143-150.

Capecchi M. R., (2000). How close are we to implementing gene targeting in animals other than the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA; 97: 956-57

Carroll S. B., Grenier J. and Weatherbee S. D., (2005). From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design. Second Edition. Oxford: Blackwell Publishing.

Choi D. W., and Close T. J., (2000). A newly identified barley gene, *Dhn12*, encoding a *YSK2 DHN*, is isolated on chromosome 6H and has embryo-specific expression. *Theor. Appl. Genet.*; 100:1274-1278.

Choi D. W., Zhu B., and Close T. J., (1999). The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 *Dhn* genes of cv. Dicktoo. *Theor. Appl. Genet.*; 98: 1234-1247.

Chuang C.F. and Meyerowitz E. M., (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA; 97:4985-90

Churchill F.B., (1974). William Johannsen and the genotype concept. *J History of Biology*; 7: 5-30.

Coassin S., Brandstätter A.and Kronenberg F., (2008). An optimized procedure for the design and evaluation of Ecotilling assays. *BMC Genomics*; 9:510

CODDLE: Codons Optimized to Discover Deleterious LEsions [http://www.proweb.org/coddle] webcite

Colbert T., Till B. J., Tompa R., Reynolds S., Steine M. N., Yeung T., McCallum C. M., Comai L. and Henikoff S., (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.*; 126:480-484

Comai L., Young K., Till B. J., Reynolds S. H., Greene E. A., Codomo C. A., Enns L. C., Johnson J. E., Burtner C., Odden A. R. and Henikoff S., (2004). Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by EcoTILLING. *Plant J.*; 37:778–786.

Collard B. C. Y., Vera Cruz C. M., McNally K. L., Virk P.S. and Mackill D. J., (2008). Rice Molecular Breeding Laboratories in the Genomics Era: Current Status and Future Considerations. *International Journal of Plant Genomics*; 2008:25

Comai L. and Henikoff S., (2006). TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery. *The Plant J.*; 45 (4): 648-649

Cooper J. L., Till B. J., Laport R. G. , Darlow M. C., Kleffner J. M., Jamai A., El-Mellouki T., Liu S., Ritchie R., Nielsen N., Bilyeu K. D., Meksem K., Comai L., and Henikoff S., (2008a). TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biol.*; 8: 9

Cooper J. L., Greene E. A., Till B. J., Codomo C. A., Wakimoto B. T. and Henikoff S., (2008b). Retention of Induced Mutations in a *Drosophila* Reverse-Genetic Resource. *Genetics*; 180(1): 661–667

Dalmais M., Schmidt J., Le Signor C., Moussy F., Burstin J., Savois V., Aubert G., Brunaud V., de Oliveira Y., Guichard C., Thompson R., Bendahmane A., (2008). UTILLdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. *Genome Biol.* 2008; 9(2): R43

David A. Lightfoot D. A., (2008). Soybean Genomics: Developments through the Use of Cultivar “Forrest”. *Int J Plant Genomics*; 2008: 793158

Dierking E. C. and Bilyeu K. D., (2009). New sources of soybean seed meal and oil composition traits identified through TILLING. *BMC Plant Biol.*; 9: 89

Dong C., Vincent K. and Sharp P., (2009). Simultaneous mutation detection of three homoeologous genes in wheat by High Resolution Melting analysis and Mutation Surveyor®. *BMC Plant Biol.*; 9: 143

Doniger S. W., Kim H. S., Swain D., et al. (2008). "A catalog of neutral and deleterious polymorphism in yeast". *PLoS Genet.*; 4 (8): e1000183.

Drake J. W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J. F., (1998). Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics*; 148(4):1667-86.

Drake J. W. and Holland J. J., (1999). "Mutation rates among RNA viruses". *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A.; 96 (24): 13910–13913.

Elias R., J Till B. J., Chikelu Mba C. and Bassam Al-Safadi B., (2009). Optimizing TILLING and Ecotilling techniques for potato (*Solanum tuberosum* L). *BMC Res Notes.*; 2: 141

Ellis N. A., Ciocci S. and German J., (2001). "Back mutation can produce phenotype reversion in Bloom syndrome somatic cells". Hum Genet 108 (2): 167–73.

Freese E., (1959a). "The Difference between Spontaneous and Base-Analogue Induced Mutations of Phage *T4*". *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A.; 45 (4): 622–633.

Freese E., (1959b). "The Specific Mutagenic Effect of Base Analogues on Phage T4". *J. Mol. Biol.*; 1: 87–105.

Gichner T. and Veleminsky J., (1977). The very low mutagenic activity of sodium azide in *Arabidopsis thaliana. Biol. Plantarum*; 19: 153-155.

Gilchrist E.J., O'Neil N. J., Rose A. M., Zetka M. C. and Haughn G. W., (2006). TILLING is an effective reverse genetics technique for *Caenorhabditis elegans. BMC Genomics*; 7:262

Goda T., Abu-Daya A., Carruthers S., Clark M. D., Stemple D. L. and Zimmerman L. B., (2006). Genetic Screens for Mutations Affecting Development of *Xenopus tropicalis*. *PLoS Genet.*; 2(6): 91

Goff S. A., Ricke D., Lan T. H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., Katagiri F., Lange B. M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colbert M., Sun W. L., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T. C., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R. M.,

Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalma T., Oliphant A. and Briggs S., (2002). A draft sequence of the rice genome. *Science*; 296: 92-100

Goll M. G. and Bestor T. H., (2002). Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes Dev.*; 16:1739-42

González-César E. and Ramos-Morales P., (1997). Sodium azide induces mitotic recombination in Drosophila melanogaster larvae. *Mutat Res Gen Tox En*; 389: 157-165.

Gottwald S., Bauer P., Komatsuda T., Lundqvist U. and Stein N., (2009). TILLING in the two-rowed barley cultivar 'Barke' reveals preferred sites of functional diversity in the gene *HvHox1*. *BMC Res. Notes*; 2: 258.

Grant W. F. and Salamone M. F., (1994). Comparative mutagenecity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutat Res Fund Mol M*; 310: 187-209.

Greene E. A., Codomo C. A., Taylor N. E., Henikoff J. G., Till B. J., Reynolds S. H., Enns L. C., Burtner C., Johnson J. E., Odden A. R., Comai L. and Henikoff S., (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* 164: 731-40

Harrison P. and Gerstein M., (2002). "Studying genomes through the aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution". *J. Mol. Biol.*; 318 (5): 1155–1174.

Hastings P., Lupski J., Rosenberg J. R., Ira S. M. G., (2009). "Mechanisms of change in gene copy number". Nature Reviews. *Genetics*; 10 (8): 551–564.

Henikoff S. and Comai L., (2003). Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annual Review of Plant Biology*; 54: 375–401.

Holland J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S. and VandePol S., (1982). "Rapid evolution of RNA genomes". Science 215 (4540): 1577–85.

Horst I., Welham T., Kelly S., Kaneko T., Sato S., Tabata S., Parniske M., and Wang T. L. (2007). TILLING mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. Plant Physiol 144: 806–820

Hsia A. P., Wen T. J., Chen H. D., Liu Z., Yandeau-Nelson M. D., Wei Y., Guo L. and Schnable P. S., (2005). Temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE) as a tool for the high-throughput discovery and mapping of SNPs and IDPs. *Theor. Appl. Genet.*; 111(2):218-225.

Hirochika H., (1997). Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis. *Plant Mol. Biol.*; 35: 231-40

Hurst G. D. and Werren J. H., (2001). "The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution". *Nat. Rev. Genet.*; 2 (8): 597–606.

Ionov Y., Peinado M. A., Malkhosyan S., Shibata D. and Perucho M., (1993). "Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis". *Nature*; 363 (6429): 558–561.

Jansen G., Hazendonk E., Thijssen K. L., Plasterk R. H., (1997). Reverse genetics by chemical mutagenesis in Caenorhabditis elegans. *Nat. Genet.* 17: 119-21

Johannsen W., (1911). The genotype conception of heredity. *American Naturalist*; 45: 129-159

Kamra O. P., Gallopudi B., (1979). Mutagenic effects of sodium azide in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.*; 251: 381-384.

Kanaya N., Gill B. S., Grover I. S., Murin A., Osiecka R., Sandhu S. S., Andersson H. C., (1994). *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutat. Res. Fund. Mol. M.*, 310: 231-247.

Khush G. S., (2001). Green revolution: the way forward. *Nat. Rev. Genet.*; 2: 815-22

Kleinhofs A., Owais W. M., Nilan R. A., (1978). Azide. *Mutat. Res.*; 55: 165-195.

Kobayashi Y., Narumi I., Satoh K., Funayama T., Kikuchi M., Kitayama S., Watanabe H., (2004). Radiation response mechanisms of the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans. Biol. Sci. Space.*; 18(3):134-135.

Koornneef M, Dellaert LW, van der Veen JH., (1982). EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Mutat. Res. 93:109–23

Kowalski D., Kroeker W. D. and Laskowski M., (1976). Mung bean nuclease I. Physical, chemical and catalytical properties. *Biochemistry* 15: 4457-4462.

Kowalski D., Natale D. A. and Eddy M. J., (1988) Stable DNA unwinding, not "breathing," accounts for single-strand-specific nuclease hypersensitivity of specific A+T-rich sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA; 85: 9464-9468

Kozmin S., Slezak G., Reynaud-Angelin A., Elie C., de Rycke Y., Boiteux S. and Sage E., (2005). "UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7,8-dihydro-8-oxoguanine in Saccharomyces cerevisiae". *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A.; 102 (38): 13538–13543.

Krawczak M., Ball E. V., Fenton I., Stenson P. D., Abeysinghe S., Thomas N. and Cooper D. N., (2000). Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. *Hum. Mutat.*; 15: 45-51.

Krysan P. J., Young J. C., Jester P. J., Monson S., Copenhaver G., Preuss D., Sussman M. R., (2002). Characterization of T-DNA insertion sites in *Arabidopsis thaliana* and the implications for saturation mutagenesis. *OMICS*; 6:163-74

Lababidi S., Mejhede N., Rasmussen S. K., Backes G., Al-Said W., and Baum M., (2009).Identification of barley mutants in cultivar 'Lux' at the *Dhn* loci through TILLING. *Plant Breeding*; 128 (4): p332-336

Lacks S. A., (1981) Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin. *J. Biol. Chem.*; 256: 2644-2648.

Li X., Song Y., Century K., Straight S., Ronald P., Dong X., Lassner M., Zhang Y., (2001). A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. *Plant J.*; 27: 235-242

Li Q., Liu Z., Monroe H., Culiat C. T., (2002). Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 23:1499-511

Linn S. M., Lloyd R. S. and Roberts, R. J., Eds., (1993) in Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J., (2004). *Molecular Biology of the cell*, p963. WH Freeman: New York, NY. 5th ed.

Maekawa K., Tsunasawa S., Dibo G., Sakiyama F., (1991). Primary structure of nuclease P1 from Penicillium citrinum. Eur J Biochem; 200: 651-661

Martín B., Ramiro M., Martínez-Zapater J. M. and Alonso-Blanco C., (2009). A high-density collection of EMS-induced mutations for TILLING in Landsberg *erecta* genetic background of *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.*; 9: 147

McCallum C. M., Comai L., Greene E. A., Henikoff S., (2000). Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.*; 18: 455-457

Meissner R., Jacobson Y., Melamed S., Levyatuv S., Shalev G., Ashri A., Elkind Y. and Levy A., (1997). A new model system for tomato genetics. *Plant J.*; 12: 1465-72

Mejlhede N. , Kyjovska Z. , Backes G. , Burhenne K. , Rasmussen S. K. and Jahoor A., (2006). EcoTILLING for the identification of allelic variation in the powdery mildew resistance genes *mlo* and *Mla* of barley. *Plant breeding*; 125 (5):461-467

Minoia S., Petrozza A., D'Onofrio O., Piron F., Mosca G, Sozio G., Cellini F., Bendahmane A. and Carriero F., (2010). A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Res Notes.*; 3: 69

Muller H. J., (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.*; 22: 299-334

Murphey R. D., Zon L. I., (2002). Attack of the fish clones. *Nat. Biotechnol.*; 20: 785-86

Nachman S. and Crowell L., (2000) Estimate of the Mutation Rate per Nucleotide in Humans. *Genetics*; 156: 297-304

Ng P. C. and Henikoff S., (2002). Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res.*; 12: 436-446.

Ng P. C. and Henikoff S., (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research*; 31(13): 3812-3814

Nickerson D. A., Kolker N., Taylor S. L., Rieder M. J., (2001). Sequence-based detection of single nucleotide polymorphism. *Methods Mol. Biol.*; 175:29-35

Nieto E., Piron F., Dalmais M., Marco C. F., Moriones E., Gómez-Guillamón M. L., Truniger V., Gómez P., Garcia-Mas J., Aranda M. A. and Bendahmane A., (2007).EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon *eIF4E*, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biol.*; 7: 34

Oleykowski C. A., Bronson Mullins C. R., Godwin A. K. and Yeung A. T., (1998). Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucl. Acids Res.*; 4597-4602

Owais W. M. and Kleinhofs A., (1988). Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems. *Mutat. Res.*; 197: 313-323.

Pearson W., Nilan R. A., Sander C., (1975). The effect of sodium azide on cell processes in the embryonic barley shoot. *Radiat. Bot.*; 15: 315-322.

Perry, J. A., Wang T. L., Welham T. J., Gardner S., Pike J. M., Yoshida S. and Parniske M., (2003). A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonica*. *Plant Phys.*; 131: 866-871.

Perry J., Brachmann A., Welham T., Binder A., Charpentier M., Groth M., Haage K., Markmann K., Wang T. L. and Parniske M., (2009). TILLING in *Lotus japonicus* Identified Large Allelic Series for Symbiosis Genes and Revealed a Bias in Functionally Defective Ethyl Methanesulfonate Alleles toward Glycine Replacements. *Plant Physiol.*; 151(3): 1281–1291

Pfohl-Leszkowicz A. and Manderville R. A., (2007). "Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans". *Mol. Nutr. Food Res.*; 51 (1): 61–99.

Pilon L., Langelier Y. and Royal A., (1986). "Herpes simplex virus type 2 mutagenesis: characterization of mutants induced at the hprt locus of nonpermissive XC cells". *Mol. Cell. Biol.*; 6 (8): 2977–2983.

Porceddu A., Panara F., Calderini O., Molinari L., Taviani P., Lanfaloni L., Scotti C., Carelli M., Scaramelli L., Bruschi G., Cosson V., Ratet P., de Larembergue H., Duc G., Piano E. and Arcioni S., (2008). An Italian functional genomic resource for *Medicago truncatula*. *BMC Res Notes.*; 1: 129

Premstaller A., Oberacher H., Rickert A., Huber C. G., Oefner P. J., (2002). Multiplex analysis of single-nucleotide extension products on a 16-capillary, denaturing, high-performance liquid chromatography array. *Genomics*; 79: 793-98

Raicu P. and Mixich F., (1992). Cytogenetic effects of sodium azide encapsulated in liposomes on heteroploid cell cultures. *Mutat. Res.*; 283: 215-219.

Rasmussen S. K. and Hatzack F., (1998). Identification of two low-phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) grain mutants by TLC and genetic analysis. *Hereditas*; 129: 107-112.

Redei G. P and Koncz C., (1992). Classical mutagenesis. In: Methods in *Arabidopsis* Research, ed. C. Koncz, N-H Chua, J Schell, pp. 16-82. Singapore: World Sci.

Rice M. C., May G. D., Kipp P. D., Parekh H., Kmiec E. B., (2000). Genetic repair of mutations in plant cell-free extracts directed by specific chimeric oligonucleotides. *Plant Physiol.*; 123: 427-38

Rines H. W., (1985). Sodium azide mutagenesis in diploid and hexaploid oats and comparison with ethyl methane-sulfonate treatments. *Environ Exp. Bot.*; 25: 7-16.

Rong Y. S. and Golic, K. G., (2000). Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science*; 288(5473): 2013-2018.

Roulston A., Marcellus R. C., Branton P. E., (1999). "Viruses and apoptosis". *Annu. Rev. Microbiol.*; 53: 577-628.

Roy S., Khanna S., Bentley K., Beffrey P., Sen C. K., (2002). Functional genomics: highdensity oligonucleotide arrays. Methods Enzymol. 353:487–97

Russell P. J., (2000). Fundamentals of Genetics (2nd Edition). Addison Wesley Longman; pp 527.

Saghai-Maroof M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A. and Allard R. W., (1984). Ribosomal DNA spacre-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Nalt. Acad. Sci.* USA; 81: 8014-8018

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis J., (1989). Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sawyer S. A., Parsch J., Zhang Z. and Hartl D. L., (2007). "Prevalence of positive selection among nearly neutral amino acid replacements in Drosophila". *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A.; 104 (16): 6504–6510.

Schaefer D. G., 2001. Gene targeting in Physcomitrella patens. *Curr. Opin. Plant Biol.*; 4: 143-150

Schönthal A. H., (2004). Methods in Molecular Biology, vol. 280: Checkpoint Controls and Cancer, Volume 1: Reviews and Model Systems. Humana Press Inc., Totowa, NJ

Schuch W., (1991). Using antisense RNA to study gene function. *Symp. Soc. Exp. Biol.*; 45: 117-27

Shenk T. E., Rhodes C., Rigby P. W. J. and Berg P., (1975). Biochemical Method for Mapping Mutational Alterations in DNA with *S1* Nuclease: The Location of Deletions and Temperature-Sensitive Mutations in Simian Virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA; 72: 989-993.

Sideris E. G., Nilan R. A. and Bogyo T. P., (1973). Differential effect of sodium azide on the frequency of radiation-induced chromosome aberrations vs. the frequencies of radiation-induced chlorophyll mutations in Hordeum vulgare. *Radiat. Bot.*; 13: 315-322.

Slade A. J., Fuerstenberg S., Loeffler D., Steine M. N. and Facciotti D., (2005). A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat. Biotechnol.*; 23: 75-81.

Ionov **P., Gerrish P., Johnson T. and Shaver A.**, (2000). "The evolution of mutation rates: separating causes from consequences". *Bioessays.*; 22 (12): 1057–1066.

Sreelakshmi Y., Gupta S., Bodanapu R., Chauhan V. S., Hanjabam M., Thomas S., Mohan V., Sharma S., Srinivasan R. and Sharma R., (2010). NEATTILL: A simplified procedure for nucleic acid extraction from arrayed tissue for TILLING and other high-throughput reverse genetic applications. *Plant Methods*; 2010, 6: 3

Stadler L. J., (1932). On the genetic nature of induced mutations in plants. *Proc. Congr. Genet.*; 6(1): 274-94

Struhl K., Stinchcomb D. T., Scherer S., Davis R. W., (1979). High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA; 76: 1035-1039

Talame` V., Bovina R., Sanguineti M. C., Tuberosa R., Lundqvist U., and Salvi S., (2008). TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. *Plant Biotechnol. J.*; 6: 477-485.

Talon M. and Gmitter F., (2008). Citrus Genomics. *International Journal of Plant Genomics*; 2008:17

Taylor N. and Greene E.A., (2003) PARSESNP: A tool for the analysisof nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 31: 3808-3811.

Till B. J., Colbert T., Tompa R., Enns L., Codomo C., Johnson J. E., Reynolds S. H. , Henikoff J. G. , Greene E. A. , Steine M. N., Comai L. and Henikoff S., (2003a). High-throughput TILLING for functional genomics. In Plant functional genomics: Methods and Protocols, ed. E Grotewald. Totowa, NJ: Humana. Volume 236, p 205-220

Till B. J., Reynolds S. H., Greene E. A., Codomo C. A., Enns L. C., Johnson J. E., Burtner C., Odden A. R., Young K., Taylor N. E., Henikoff J. G., Comai L., and Henikoff S., (2003b). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res.*; 13(3): 524-530

Till B. J., Reynolds S. H., Weil C., Springer N., Burtner C., Young K., Bowers E., Codomo C. A., Enns L. C., Odden A. R., Greene E. A., Comai L. and Henikoff S., (2004a). Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol.*; 4: 12

Till B. J., Burtner C., Comai L. and Henikoff S., (2004b). Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic Acids Research*; 32 (8): 2632-2641

Till1 B. J., Zerr1 T., Bowers E., Greene1 E. A., Comai L. and Henikoff S., (2006). High-throughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by Ecotilling. *Nucleic Acids Research*, 34(13):12

Till B. J., Cooper J., Tai T. H., Colowit P., Greene E. A., Henikoff S. and Comai L., (2007). Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol.*; 7: 19.

Triques K., Piednoir E., Dalmais M., Schmidt J., Le Signor C., Sharkey M., Caboche M., Sturbois B. and Bendahmane A., (2008). Mutation detection using ENDO1: Application to disease diagnostics in humans and TILLING and Eco-TILLING in plants. *BMC Molecular Biology*; 9:42

Triques K., Sturbois B., Gallais S., Dalmais M., Chauvin S., Clepet C., Aubourg S., Rameau C., Caboche M. and Bendahmane A., (2007). Characterization of *Arabidopsis* thaliana mismatch specific endonucleases: Application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant J.*; 51:1116-1125.

Uauy C., Paraiso F., Colasuonno P., Tran R. K., Tsai H., Berardi S., Comai L. and Dubcovsky J., (2009). A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. *BMC Plant Biol.* 9:115

Underhill P. A., Jin L., Lin A. A., Mehdi S. Q., Jenkins T., Vollrath D., Davis R. W., Cavalli-Sforza L. L. and Oefner P. J., (1997). Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.*; 7: 996-1005

Vaucheret H., Beclin C. and Fagard M., (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.*; 114: 3083-3091

Veleminsky J., Anglis K. J., (1987). Effects of sodium azide on replicative and repair DNA synthesis in barley embryos. *Mutat Res*; 190: 125-129.

Wang H. X., Viret J. F., Eldridge A., Perera R., Signer E. R., and Chiurazzi M., (2001). Positive-negative selection for homologous recombination in *Arabidopsis*. *Gene.*; 272:249–55

Waterhouse P. M., Graham M. W. and Wang M. B., (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA; 95: 13959-13964

Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A., Levine M. and Losick R., (2004). Molecular Biology of the Gene, ch. 9 and 10. Peason Benjamin Cummings; CSHL Press. 5th ed.

Weil C. F., Monde R. A., (2007). Getting to the point - Mutations in maize. *Crop Sci.*; 47: S60-S67.

Weil C., (2009). TILLING in Grass Species. *Plant Physiology*; 149:158–164

Wen J. G. and Liang H. G., (1995). Effects of KCN and NaN3 pretreatment on the cyanide-resistant respiration in tobacco callus. *Acta. Bot. Sin.*; 37: 711-717.

Wienholds E., Schulte-Merker S., Walderich B. and Plasterk R. H., (2002). Target-selected inactivation of the zebrafish *rag1* gene. *Science*; 297: 99-102

Wienholds E., van Eeden F., Kosters M., Mudde J., Plasterk R. H. and Cuppen E., (2003). Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res.*;13: 2700-2707

Winkler S., Schwabedissen A., Backasch D., Bökel C., Seidel C., Bönisch S., Fürthauer M., Kuhrs A., Cobreros L., Brand M., and González-Gaitán M., (2005). Target-selected mutant screen by TILLING in *Drosophila*. *Genome Res.*; 15: 718-723

Wu J. L., Wu C., Lei C., Baraoidan M., Bordeos A., Madamba M. R., Ramos-Pamplona M., Mauleon R., Portugal A., Ulat V. J., Bruskiewich R., Wang G., Leach J., Khush G. and Leung H., (2005).

Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol Biol.*; 59(1): 85-97.

Xin Z., Wang M. L., Barkley N. A., Burow G., Franks C., Pederson G. and John Burke J., (2008). Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population *BMC Plant Biol.*; 8: 103

Yamazaki M., Tsugawa H., Miyao A., Yano M., Wu J., Yamamoto S., Matsumoto T., Sasaki T. and Hirochika H., (2001). The rice retrotransposon Tos17 prefers low-copy-number sequences as integration targets. *Mol. Genet. Genomics*; 265: 336-344

Yang B., Wen X., Kodali N. S., Oleykowski C. A., Miller C. G., Kulinski J., Besack D., Yeung J. A., Kowalski D. and Yeung A. T., (2000). Purification, cloning, and characterization of the Cel I nuclease. *Biochemistry*; 39: 3533-3541

Yu J., Hu S., Wang J., Wong G. K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., Cao M., Liu J., Sun J., Tang J., Chen Y., Huang X., Lin W., Ye C., Tong W., Cong L., Geng J., Han Y., Li L., Li W., Hu G., Huang X., Li W., Li J., Liu Z., Li L., Liu J., Qi Q., Liu J., Li L., Li T., Wang X., Lu H., Wu T., Zhu M., Ni P., Han H., Dong W., Ren X., Feng X., Cui P., Li X., Wang H., Xu X., Zhai W., Xu Z., Zhang J., He S., Zhang J., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Ren X., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Xia H., Bao Q., Li G., Gao H., Cao T., Wang J., Zhao W., Li P., Chen W., Wang X., Zhang Y., Hu J., Wang J., Liu S., Yang J., Zhang G., Xiong Y., Li Z., Mao L., Zhou C., Zhu Z., Chen R., Hao B., Zheng W., Chen S., Guo W., Li G., Liu S., Tao M., Wang J., Zhu L., Yuan L. and Yang H., (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science*; 296: 79-92

Yuan H. Y. and Zhang Z. I., (1993). Effect of free radicals and temperature on sister chromatid exchanges in *Hordeum vulgare* L. *Acta. Bot. Sin.*; 35: 20-26.

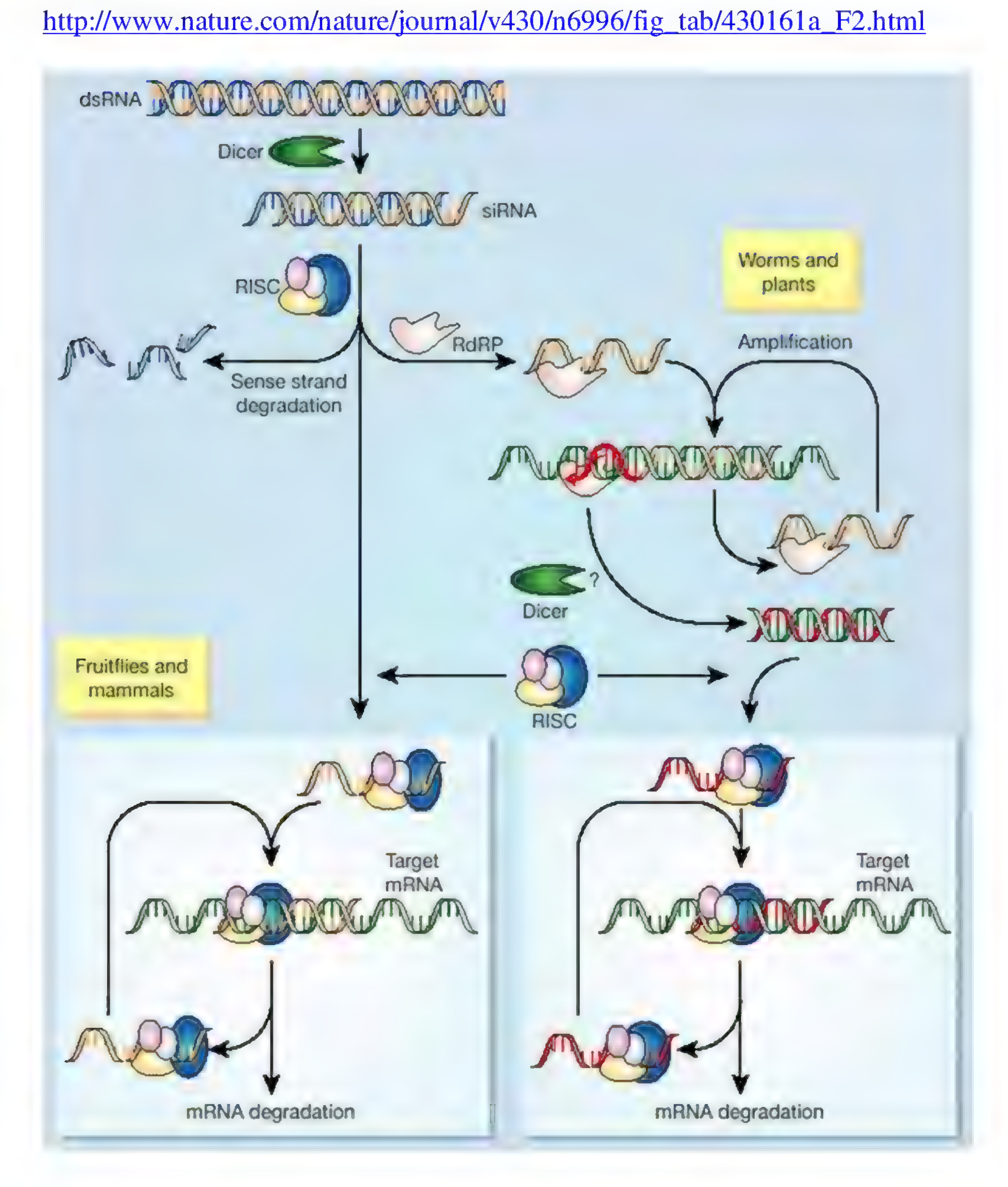
Zhu B. G., Gu A. Q., Deng X. D., Geng Y. X. and Lu Z. X., (1995). Effects of caffeine or EDTA post-treatment on EMS mutagenesis in soybean. *Mutat. Res.*; 334: 157-159

10. الملحق

ملحق 1:

Short interfering RNAs-Post Transcriptional Gene Silencing

Source:
http://www.nature.com/nature/journal/v430/n6996/fig_tab/430161a_F2.html



RNAi is triggered when a cell encounters a long double-stranded RNA (dsRNA), which might be produced from an introduced transgene, a viral intruder or a rogue genetic element. An enzyme called Dicer cleaves the long dsRNA into siRNAs. An RNA-induced silencing complex (RISC) then distinguishes between the different strands of the siRNA. The sense strand (blue) is degraded. The antisense strand (yellow) is used to target genes for silencing, and has one of several fates depending upon the organism. In fruitflies and mammals, the antisense strand is incorporated directly into RISC to target a complementary mRNA (green) for destruction. In the absence of siRNAs, the RISC lacks sequence-specific mRNA-binding properties. But when bound to the antisense strand, the now activated RISC can participate in repeated cycles of degradation of specific mRNAs, such that no protein is made - effectively silencing the gene from which the mRNAs are produced. In worms and plants, the antisense strand of the siRNA might first be used in an amplification process. The antisense strand, bound by an RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) enzyme, can pair up with a complementary mRNA (green) and act as a start point for the synthesis of a new long dsRNA. Dicer is then required to generate new siRNAs (red), which are specific to different sequences on the same mRNA. Again, the target mRNA is destroyed.

ملحق 2:

RNA interference

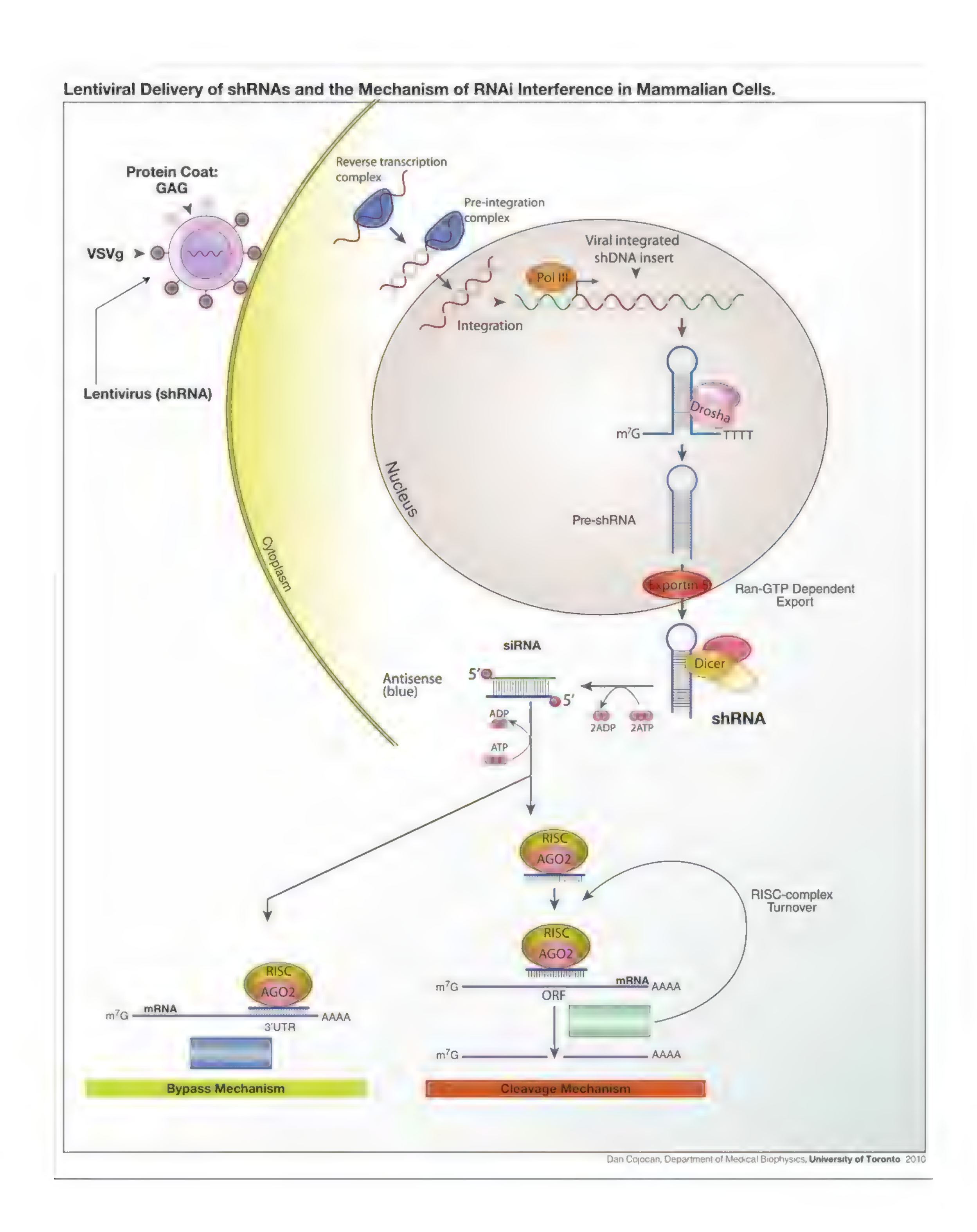
Source: http://en.wikipedia.org/wiki/RNA_interference

RNA interference (**RNAi**) is a system within living cells that helps to control which genes are active and how active they are. Two types of small RNA molecules – microRNA (miRNA) and small interfering RNA (siRNA) – are central to RNA interference. RNAs are the direct products of genes, and these small RNAs can bind to specific other RNAs and either increase or decrease their activity, for example by preventing a messenger RNA from producing a protein. RNA interference has an important role in defending cells against parasitic genes – viruses and transposons – but also in directing development as well as gene expression in general.

The RNAi pathway is found in many eukaryotes including animals and is initiated by the enzyme Dicer, which cleaves long double-stranded RNA (dsRNA) molecules into short fragments of ~20 nucleotides. One of the two strands of each fragment, known as the *guide strand*, is then incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC). The most well-studied outcome is post-transcriptional gene silencing, which occurs when the guide strand base pairs with a complementary sequence of a messenger RNA molecule and induces cleavage by Argonaute, the catalytic component of the RISC complex. This process is known to spread systemically throughout the organism despite initially limited molar concentrations of siRNA.

The selective and robust effect of RNAi on gene expression makes it a valuable research tool, both in cell culture and in living organisms because synthetic dsRNA introduced into cells can induce suppression of specific genes of interest. RNAi may also be used for large-scale screens that systematically shut down each gene in the cell, which can help identify the components necessary for a particular cellular process or an event such as cell division. Exploitation of the pathway is also a promising tool in biotechnology and medicine.

Historically, RNA interference was known by other names, including post transcriptional gene silencing, and quelling. Only after these apparently unrelated processes were fully understood did it become clear that they all described the RNAi phenomenon. In 2006, Andrew Fire and Craig C. Mello shared the Nobel Prize in Physiology or Medicine for their work on RNA interference in the nematode worm *C. elegans*, which they published in 1998



Lentiviral Delivery of shRNAs and the Mechanism of RNAi Interference in Mammalian Cells.
Protein Coat: GAG
VSVg
Lentivirus (shRNA)
Reverse transcription complex
Pre-integration complex
Viral integrated shDNA insert
Pol III
Integration
Drosha
m7G
TTTT
Nucleus
Cytoplasm
Pre-shRNA
Exportin 5
Ran-GTP Dependent Export
siRNA
Antisense (blue)
5′
5′
ADP
ATP
2ADP
2ATP
Dicer
shRNA
RISC
AGO2
RISC-complex Turnover
mRNA
AAAA
ORF
3'UTR
Bypass Mechanism
Cleavage Mechanism
Dan Cojocan, Department of Medical Biophysics, University of Toronto 2010

ملحق 3:

Antisense Technology

Overview

Antisense technology is a tool that is used for the inhibition of gene expression. The principle behind it is that an antisense nucleic acid sequence base pairs with its complementary sense RNA strand and prevents it from being translated into a protein. The complimentary nucleic acid sequence can be either a synthetic oligonucleotide, often oligodeoxyribonucleotides (ODN) of less than 30 nucleotides, or longer antisense RNA (aRNA) sequences. An example of sense and antisense RNA is: 5´ A C G U 3´ mRNA, and 3´ U G C A 5´ Antisense RNA

This type of technology was first developed by Dr. Hal Weintraub and his colleagues at the Basic Science Division in the early 1980s. They were the first to show that aRNA could inhibit gene expression in mouse cells (Berg, 2002). Then in 1996, Dr. Meng-Chao Yao, also at the BSD, showed how aRNA that was incorporated into non-conserved regions of ribosomal RNA (rRNA) could also disrupt translation by altering the interaction of the mRNA and the rRNA/aRNA chimera.

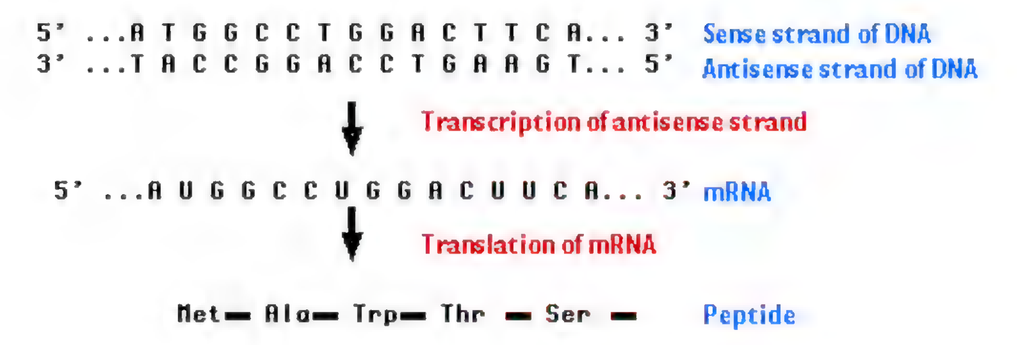


Figure1. Cartoon sequence of transcription of antisense DNA strand into the sense mRNA strand, which is then translated into a polypeptide.

Theories on how inhibition works

When the aRNA binds to the complementary mRNA, it forms a double-stranded RNA (dsRNA) complex that is similar to double-stranded DNA. The dsRNA complex does not allow normal translation to occur. The exact mechanism by which translation is blocked is unknown. Several theories include:

- that the dsRNA prevents ribosomes from binding to the sense RNA and translating
- the dsRNA cannot be transported from within the nucleus to the cytosol, which is where translation occurs or,
- that dsRNA is susceptible to endoribonucleases that would otherwise not affect single stranded RNA, but degrade the dsRNA

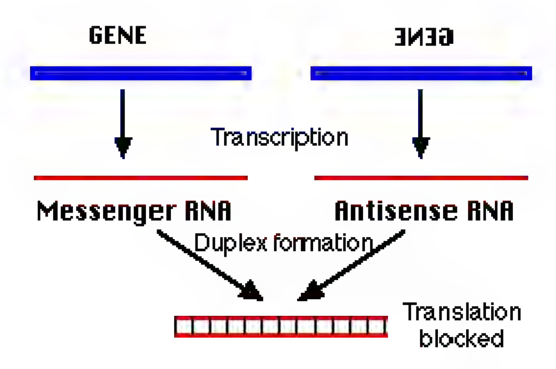
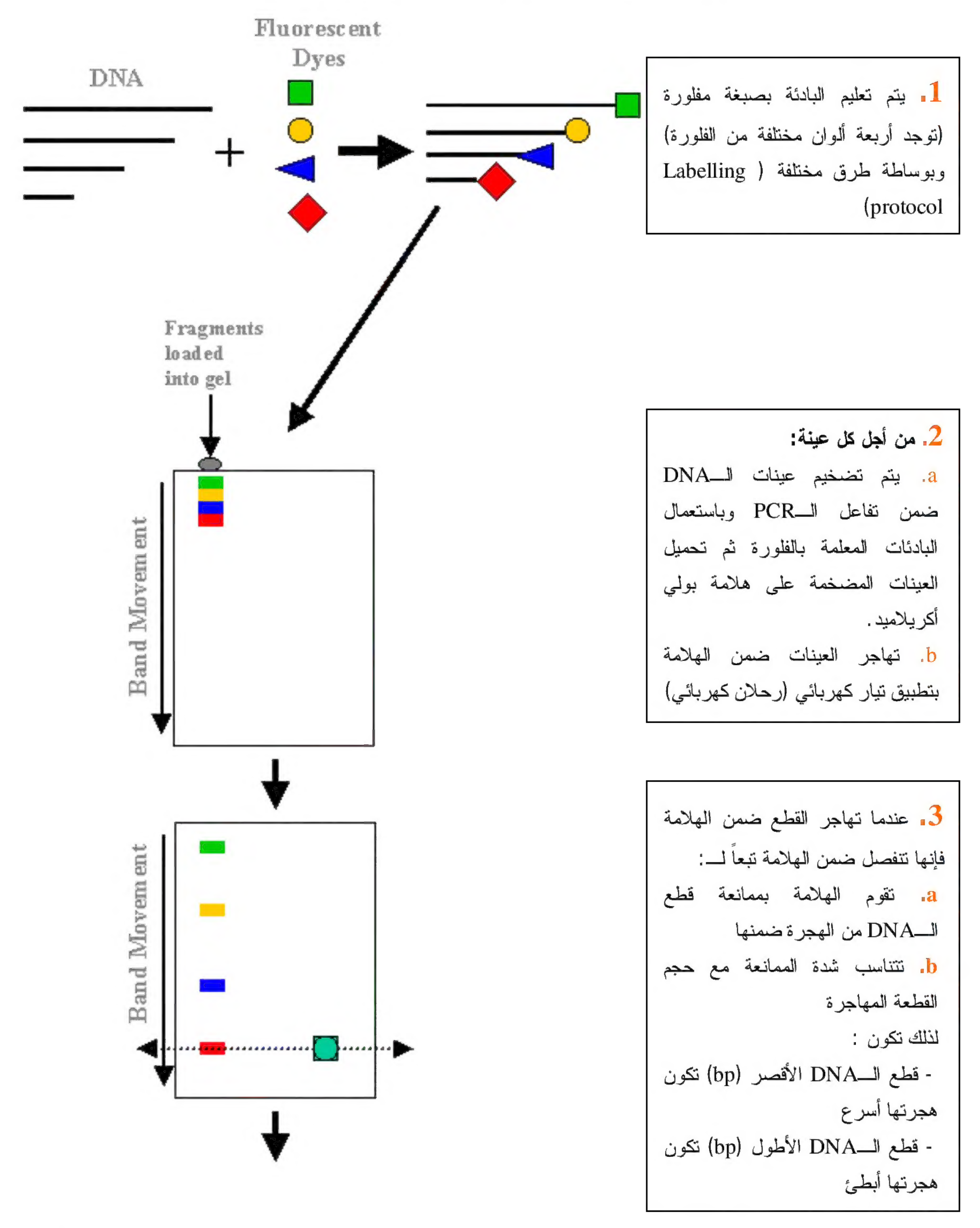


Figure 2. Cartoon of how sense mRNA and antisense RNA are trascribed and then anneal to form double-stranded RNA, which blocks translation of the protein coded for by the sense mRNA.

ملحق 4:

مبدأ عمل جهاز الــABI

Overview of ABI 377 Operational Principles



.1 يتم تعليم البادئة بصبغة مفلورة (توجد أربعة ألوان مختلفة من الفلورة) وبوساطة طرق مختلفة (Labelling protocol)

.2 من أجل كل عينة:

.a يتم تضخيم عينات الـــDNA ضمن تفاعل الـــPCR وباستعمال البادئات المعلمة بالفلورة ثم تحميل العينات المضخمة على هلامة بولي أكريلاميد.

.b تهاجر العينات ضمن الهلامة بتطبيق تيار كهربائي (رحلان كهربائي)

.3 عندما تهاجر القطع ضمن الهلامة فإنها تنفصل ضمن الهلامة تبعاً لـــ:

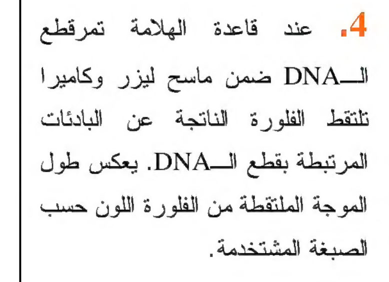
.a تقوم الهلامة بممانعة قطع الـــDNA من الهجرة ضمنها

.b تتناسب شدة الممانعة مع حجم القطعة المهاجرة

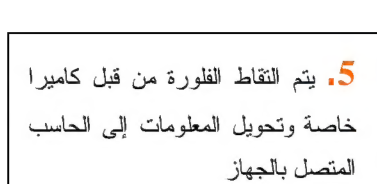
لذلك تكون :

- قطع الـــDNA الأقصر (bp) تكون هجرتها أسرع

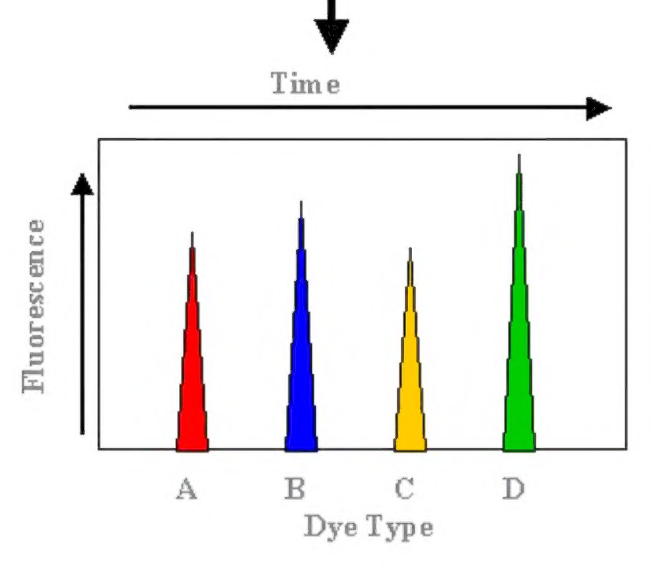
- قطع الـــDNA الأطول (bp) تكون هجرتها أبطئ



.4 عند قاعدة الهلامة تمرقطع الـــDNA ضمن ماسح ليزر وكاميرا تلتقط الفلورة الناتجة عن البادئات المرتبطة بقطع الـــDNA. يعكس طول الموجة الملتقطة من الفلورة اللون حسب الصبغة المشتخدمة.



.5 يتم التقاط الفلورة من قبل كاميرا خاصة وتحويل المعلومات إلى الحاسب المتصل بالجهاز



.6 يتم بعد ذلك تمييز قطع الـــDNA الفصولة من خلال أطوال موجاتها وبالتالي من خلال الألوان الصادرة عن كل نوع فلورة محولاً إياها إلى شكل منحني

Aleppo University
Faculty of Science
Department of Plant



Detection of Single Nucleotide Polymorphism in Barley Population

Thesis Submitted for PhD in Biology
Plant Genetic & Biodiversity

By
Samer Lababidi
Biology Graduate, Faculty of Science, Aleppo, Syria -1997
Plant Genetic Diploma, Faculty of Science, Aleppo, Syria -1998
Ms.C of Plant Genetic, Faculty of Science, Aleppo, Syria - 2004

Supervision by

Dr. Walid Al-Said
Prof in Plant Genetic
Plant Science Department
Faculty of Science
Aleppo University, Syria

Dr. Michael Baum
Head of Biodiversity and Integrated
Gene Management program
(BIGM), ICARDA
Aleppo, Syria

Celebration with

Dr. Ahmad Jahoor
Senior Barley Breeder & Biotechnologist
Copenhagen University, Denmark

Aleppo University
Faculty of Science
Department of Plant



Detection of Single Nucleotide Polymorphism in Barley Population

Thesis Submitted for PhD in Biology
Plant Genetic & Biodiversity

By
Samer Lababidi

2010
1431